

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①① N° de publication :

2 766 205

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②① N° d'enregistrement national :

97 09007

⑤① Int Cl⁶ : C 12 N 5/08, A 61 K 45/05, 48/00

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 16.07.97.

③① Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 22.01.99 Bulletin 99/03.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥① Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE
ET DE LA RECHERCHE MEDICALE INSERM ETA-
BLISS PUBLIC A CARACT SCIENT ET TECH — FR et
INSTITUT GUSTAVE ROUSSY — FR.

⑦② Inventeur(s) : ZITVOGEL LAURENCE, RAPOSO
GRACA, REGNAULT ARMELLE et AMIGORENA
SEBASTIAN.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : ERNEST GUTMANN YVES PLASSE-
RAUD SA.

⑤④ NOUVEAU PROCEDE DE SENSIBILISATION DE CELLULES PRESENTATRICES D'ANTIGENE ET NOUVEAUX
MOYENS POUR LA MISE EN OEUVRE DU PROCEDE.

⑤⑦ L'invention concerne une vésicule désignée par "exo-
some dérivé de cellules tumorales " correspondant à une
vésicule interne contenue dans un endosome d'une cellule
tumorale et sécrétée par ladite cellule tumorale suite à la fu-
sion de la membrane externe du susdit endosome avec la
membrane cytoplasmique de la susdite cellule tumorale, le-
quel exosome dérivé de cellules tumorales
- est débarrassé de son environnement naturel,
- comprend une bicouche lipidique désignée par "surfa-
ce" qui entoure une fraction cytosolique,
et éventuellement
- présente sur sa surface des molécules de classe I du
complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) et/ ou de clas-
se II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), éven-
tuellement chargées en peptides antigéniques et/ ou des
molécules d'adhésion et/ ou des molécules de co-stimula-
tion lymphocytaire,
- et/ ou contient dans sa fraction cytosolique des molé-
cules antigéniques tumorales et/ ou des immunomodula-
teurs et/ ou chemo-attracteurs et/ ou hormones et/ ou
agents cytotoxiques des acides nucléiques.

FR 2 766 205 - A1



NOUVEAU PROCÉDÉ DE SENSIBILISATION DE CELLULES PRÉSENTATRICES D'ANTIGÈNE ET NOUVEAUX MOYENS POUR LA MISE EN OEUVRE DU PROCÉDÉ.

5

L'invention a pour objet un nouveau procédé de sensibilisation de cellules présentatrices d'antigène et de nouveaux moyens pour la mise en oeuvre du procédé.

10

15

20

25

Depuis la démonstration de l'existence de lymphocytes T cytotoxiques CD8+ spécifiques d'antigènes tumoraux présentés dans le contexte des molécules de classe I du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) (Rosenberg et coll., 1996; Boon, 1992), plusieurs laboratoires ont pu montrer que l'immunothérapie anti-tumorale est une stratégie thérapeutique efficace dans les modèles animaux (Pardoll, 1995). Le principe de l'immunothérapie est d'induire une réponse immunitaire efficace contre des antigènes spécifiques de tumeurs. A ce jour, cela a pu être effectué de différentes façons. Tout d'abord, des cellules tumorales exprimant des molécules de co-stimulation recombinantes et/ou des cytokines immunomodulatrices sont capables de stimuler des réponses anti-tumorales capables d'éradiquer des tumeurs solides *in vivo* (Zitvogel et coll., 1996 [a]). De même, des peptides dérivés d'antigènes tumoraux (ou d'antigènes exogènes exprimés dans les cellules tumorales) injectés sous différentes formes chimiques y compris l'utilisation de liposomes comme vecteurs, sont capables de faire régresser des tumeurs (Pardoll, 1995). Finalement, des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles, comme les cellules dendritiques sensibilisées avec des peptides dérivés d'antigènes tumoraux, re-injectées *in vivo* induisent des réponses anti-tumorales puissantes, ainsi que la régression de tumeurs solides établies de la souris (Mayordomo et coll., 1995).

30

35

L'immunothérapie basée sur l'utilisation des cellules dendritiques a pu montrer son efficacité dans les études réalisées chez la souris. De ce fait, cette thérapie a été récemment transposée en clinique. Aux Etats-Unis, des essais sont actuellement en cours afin de démontrer que des cellules dendritiques chargées de peptides tumoraux augmentent de façon significative la fréquence de cellules T cytotoxiques spécifiques (CTL). Une limitation majeure à cette approche est la sensibilisation des cellules dendritiques avec des peptides dérivés d'antigènes tumoraux. En effet, dans la majorité des tumeurs, des antigènes spécifiques n'ont pas été identifiés. Des antigènes spécifiques de la tumeur sont seulement connus dans des cas de tumeurs induites par des virus (carcinome du col utérin), dans des cas de mélanome (antigènes du soi, antigènes mutés, antigènes de différenciation) ou dans un petit pourcentage de tumeurs du sein (oncogènes, ou produits de gènes supresseurs de tumeur ayant subi des mutations). Cependant, l'implication directe de ces peptides ou antigènes tumoraux

dans l'élimination des tumeurs chez l'homme reste à démontrer. Des méthodes nouvelles de sensibilisation des cellules présentatrices d'antigènes telles que les cellules dendritiques s'avèrent nécessaires. Ces méthodes ont pour but d'induire des réponses anti-tumorales spécifiques dans le contexte des molécules de classe I et de classe II du CMH.

La plupart des méthodes de sensibilisation de cellules dendritiques mises en oeuvre à présent utilisent des peptides correspondant à des épitopes présentés en association avec les molécules de classe I et identifiés dans les cellules tumorales grâce à des clones de CTLs spécifiques de la tumeur. Cependant, ces méthodes ne sont vraisemblablement pas optimales car elles ne tiennent pas compte des épitopes reconnus dans le contexte des molécules de classe II qui sont critiques pour la prolifération des lymphocytes T auxiliaires nécessaires à l'obtention des réponses cytotoxiques optimales. De plus, des épitopes présentés par les cellules tumorales et ceux présentés par les cellules présentatrices d'antigènes (comme par exemple les cellules dendritiques), ne sont probablement pas les mêmes. Finalement, des peptides tumoraux reconnus par les CTL sont seulement disponibles pour un petit pourcentage de patients ayant des molécules de classe I d'haplotype approprié.

La méthode de sensibilisation idéale, de façon à pouvoir être appliquée à n'importe quelle tumeur avec un risque minimale d'immunosélection, ne doit pas être restreinte à un petit nombre d'antigènes tumoraux identifiés. De même, une telle méthode devrait utiliser des antigènes protéiques intacts plutôt que des peptides, afin de permettre à la cellule dendritique de les préparer et de présenter la combinaison adéquate de peptides en association avec les molécules de classe I et de classe II, et cela pour tout individu.

Récemment, Gilboa et collaborateurs (Boczkowsky et coll., 1996) ont pu montrer que des ARN messagers préparés à partir de biopsies de tumeurs chargés dans des cellules dendritiques peuvent avoir un effet anti-tumoral *in vivo*. Cependant, les ARN sont très instables et la quantité d'ARN potentiellement intéressant comparé à l'ARN total est vraisemblablement très faible. Zitvogel et coll. (Zitvogel et coll., 1996 [b]) ont montré que des peptides tumoraux préparés à partir d'un éluat acide de tumeurs (éluat peptidique acide : EPA) peuvent être utilisés pour charger des cellules dendritiques. Ces cellules ainsi chargées, une fois injectées, ont la capacité de faire régresser des tumeurs. Cependant, dans le cas de tumeurs n'exprimant pas de molécules de classe I et qui représentent la majorité des tumeurs humaines métastatiques, dans le cas de tumeurs qui ne peuvent pas être dissociées en une suspension cellulaire, l'approche utilisant les éluats acides n'est pas très efficace et n'est pas reproductible.

De plus, dans le brevet US 5.030.621, on décrit la préparation d'un vaccin humain contre la cancer à partir de cultures de cellules tumorales.

Le procédé appliqué aux cellules tumorales pour la préparation du susdit vaccin est tel qu'on obtient notamment des protéines solubles d'origine non définie (membranaire cytosolique, mitochondriale, endosomale), y compris éventuellement des molécules sécrétées par la cellule et qui sont non désirables dans le cadre de l'utilisation dans une substance vaccinale.

Par ailleurs, on a décrit dans la demande internationale WO 97/05900, des vésicules dérivées de compartiments de molécules du CMH de classe II, sécrétée par les cellules présentatrices d'antigènes, lesquelles vésicules ont été désignées par exosomes.

Cependant, rien *a priori* ne permettait de penser que de telles vésicules pourraient être sécrétées par d'autres types de cellules.

L'un des aspects de l'invention est de proposer un nouveau procédé reproductible de sensibilisation de cellules présentatrices d'antigène par des antigènes tumoraux.

L'un des autres aspects de l'invention est de proposer un nouveau procédé reproductible de sensibilisation des cellules présentatrices d'antigène par des antigènes tumoraux, dans lequel il n'est pas nécessaire que les antigènes tumoraux soient connus.

L'un des autres aspects de l'invention est de proposer les moyens permettant d'établir une banque d'antigènes tumoraux.

L'invention concerne notamment une vésicule désignée par "exosome dérivé de cellules tumorales" correspondant à une vésicule interne contenue dans un endosome d'une cellule tumorale et sécrétée par ladite cellule tumorale suite à la fusion de la membrane externe du susdit endosome avec la membrane cytoplasmique de la susdite cellule tumorale, lequel exosome dérivé de cellules tumorales :

- est débarrassé de son environnement naturel,
- comprend une bicouche lipidique désignée par "surface" qui entoure une fraction cytosolique, et éventuellement
- présente sur sa surface des molécules de classe I du CMH et/ou de classe II du CMH, éventuellement chargées en peptides antigéniques et/ou des molécules d'adhésion et/ou des molécules de co-stimulation lymphocytaire,
- et/ou contient dans sa fraction cytosolique des molécules antigéniques tumorales et/ou des immunomodulateurs et/ou chemo-attracteurs et/ou hormones et/ou agents cytotoxiques des acides nucléiques.

De façon inattendue, il s'est avéré que les cellules tumorales sécrètent des exosomes présentant des propriétés intéressantes.

Par "cellules tumorales", on englobe également les cellules transformées ou immortalisées.

5 Selon un mode de réalisation avantageux, les exosomes de l'invention sont tels que les molécules du CMH sont chargées en peptides antigéniques et/ou expriment des molécules d'adhésion et/ou expriment des molécules de co-stimulation lymphocytaire, mais les exosomes sont dépourvus, dans leur fraction cytosolique, de molécules antigéniques tumorales et d'immunomodulateurs et d'acides nucléiques.

10 Selon un autre mode de réalisation avantageux, les exosomes de l'invention sont tels que les molécules du CMH sont "vides", c'est-à-dire non chargées de peptides antigéniques et les exosomes sont dépourvus, dans leur fraction cytosolique, de molécules antigéniques tumorales et d'immunomodulateurs et d'acides nucléiques.

15 Selon un autre mode de réalisation, les exosomes de l'invention sont tels que les molécules du CMH sont vides et les exosomes contiennent dans leur fraction cytosolique des molécules antigéniques tumorales et des immunomodulateurs et des acides nucléiques.

20 Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, les exosomes de l'invention sont tels que les molécules du CMH sont chargées en peptides antigéniques et/ou expriment des molécules d'adhésion et/ou en molécules de co-stimulation lymphocytaire et les exosomes contiennent dans leur fraction cytosolique des molécules antigéniques tumorales et des immunomodulateurs et des acides nucléiques.

25 S'agissant des exosomes dérivés de cellules tumorales, on peut citer, à titre d'exemple, des cellules de cancer de type mélanome malin (provenant de lignées primaires établies "ex vivo" ou bien de cellules dissociées provenant de la pièce opératoire) qui expriment à leur surface des peptides comme MART-1/Melan-A, dans le contexte CMH - classe 1, HLA-A*0201, et contenant l'antigène protéique MART-1.

30 On peut également citer des cellules provenant de cancer du rein (adénocarcinome à cellules claires) ou de leucémies dont les cellules expriment des produits spécifiques de translocation.

L'expression "exosome débarrassé de son environnement naturel" signifie qu'il y a eu exocytose de l'exosome hors de la cellule.

35 Cette expression peut également signifier que, non seulement l'exosome a été sécrété par la cellule lors de la fusion des endosomes multivésiculaires avec la membrane plasmique, mais qu'il n'est plus entouré des éléments solubles qui sont dans le lumen de l'endosome.

L'expression "exosomes" signifie forcément qu'ils sont hors de la cellule. Autrement, ils correspondent simplement aux vésicules internes des endosomes.

Les peptides antigéniques susceptibles de charger les molécules du CMH proviennent par exemple des antigènes suivants : ceux provenant de mélanomes tels que : MART-1, tyrosinase, MAGE-1/2/3, P53 (dans différentes tumeurs) ou Her2/Neu.

Plus généralement, on peut citer des produits de fusion/translocation, d'oncogènes ou d'anti-oncogènes, ou bien des antigènes de différenciation ou des peptides du soi ou peptides mutés.

Par molécules de co-stimulation lymphocytaire, on désigne par exemple des molécules qui donnent aux lymphocytes T des signaux complémentaires à ceux donnés lors de l'interaction des complexes Molécule de classe I et II - peptide avec le récepteur des cellules T.

On peut citer, à titre d'exemple :

CD80, CD86, ICAM, LFA, CD40, TNF R (famille) et des molécules d'adhésion ou de chemo attraction (permettant le contact entre la cellule professionnelle présentatrice d'antigène et les lymphocytes effecteurs, ou le transport intracellulaire/localisation spécifique ("trafficking/homing") d'autres cellules au site vaccinal ou inflammatoire.

Les molécules antigéniques tumorales contenues dans le cytosol des exosomes proviennent de protéines exprimées de façon sélective et/ou abondante par les cellules tumorales.

Les immunomodulateurs du cytosol des exosomes sont par exemple :

- TNF- α , ou
- Interleukine 1, ou
- Interleukine 15, ou
- C-CR (chemokines).

Les acides nucléiques du cytosol des exosomes proviennent de la cellule elle-même. Ces acides nucléiques se trouvent dans le cytosol des exosomes en conséquence directe de leur mécanisme de formation.

Une classe avantageuse d'exosomes de l'invention possède les caractéristiques suivantes :

- ce sont de petites vésicules membranaires de 60 à 80 nm sécrétées par les cellules tumorales,
- ils possèdent des molécules normalement présentes dans les endosomes,
- ils contiennent des antigènes tumoraux, comme par exemple MART-1 dans le cas de cellules de mélanome,
- ils sont dépourvus de cellules mortes, et /ou débris cellulaires

- ils sont dépourvus de contaminants tels que contaminants membranaires, réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, mitochondries ou constituants de noyaux,

- ils portent à leur membrane des molécules de classe I / II du CMH fonctionnelles chargées de peptides antigéniques tumoraux,

- ils peuvent sensibiliser *in vivo* et *in vitro* des cellules dendritiques capables ensuite d'activer des cellules T spécifiques de la tumeur,

- ils présentent la capacité lorsqu'ils sont inoculés *in vivo*, notamment en intradermique, de faire régresser des tumeurs solides établies.

- ils portent des molécules de co-stimulation lymphocytaire telles que CD40, CD80....,

- ils contiennent des interleukines, ou des chemo-attractants ou des immunomodulateurs.

Des tests permettant de vérifier que les exosomes de l'invention possèdent des molécules normalement présentes dans les endosomes consiste en la microscopie électronique et l'immunoempreinte (Western Blot). Ces tests permettent de montrer que les exosomes de l'invention expriment le récepteur de la transferrine, des molécules LAMP ("lysosome associated membrane protein" : protéine membranaire associée au lysosome), des molécules de classe I / II du CMH, des antigènes tumoraux.

Un test permettant de vérifier que les exosomes de l'invention contiennent des antigènes tumoraux est l'immunoempreinte avec un anticorps anti-MART-1.

Un test permettant de vérifier que les exosomes sont dépourvus de contaminants est la microscopie électronique et immunoempreinte avec des anticorps anti-calnexine qui est présente dans le réticulum endoplasmique.

Un test permettant de vérifier que les exosomes portent à leur membrane des molécules de classe I/II du CMH fonctionnelles chargées de peptides antigéniques tumoraux consiste en une présentation antigénique à des lymphocytes T spécifiques des antigènes de la tumeur concernée (tests de prolifération de clones T spécifiques d'antigènes et CMH classe I restreints).

On peut également utiliser un test de sécrétion de cytokines (IFN γ , GM-CSF, TNF β) par les clones T sus-cités.

Un test permettant de vérifier qu'il y a sensibilisation *in vivo* et *in vitro* des cellules dendritiques capables d'activer des cellules T spécifiques de la tumeur est donné par la Figure 7 (test de prolifération et/ou sécrétion de cytokines par les clones T spécifiques d'antigènes, par la méthode de sensibilisation croisée ("cross-priming") (exosomes d'une tumeur MART-1 +, HLA-A2- chargés sur une cellules dendritique MART-1-, HLA-A2+).

Un test permettant de vérifier que les exosomes présentent la capacité, lorsqu'ils sont inoculés, notamment en intradermique, de faire régresser des tumeurs solides établies est donné à la Figure 6.

A titre d'exemple, on pratique une injection de 10 à 40 μ g d'exosomes de tumeur en intradermique du côté homolatéral à la tumeur établie depuis 3 à 10 jours ; on observe l'animal porteur de la tumeur et la disparition progressive de la tumeur établie en 7 à 10 jours (chez les rongeurs de type souris).

Un exosome avantageux de l'invention est constitué par un exosome dérivé de cellules tumorales tel que défini ci-dessus et présentant sur sa surface des molécules de classe I et/ou de classe II du CMH, éventuellement chargées en peptides antigéniques et contenant dans sa fraction cytosolique des molécules antigéniques tumorales.

Selon un mode de réalisation avantageux, l'invention concerne un exosome dérivé de cellules tumorales tel que défini ci-dessus

- exprimant à sa surface des molécules de classe I et/ou de classe II du CMH du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), et/ou des antigènes caractérisés de tumeurs et/ou des molécules de co-stimulation lymphocytaire/adhésion et /ou des immunomodulateurs, et/ou chemo-attractants, exogènes par rapport à la cellule tumorale dont dérive l'exosome, ou

- contenant des antigènes tumoraux et/ou des immunomodulateurs et/ou des acides nucléiques ou des agents cytotoxiques ou des hormones exogènes par rapport à la cellule tumorale dont dérive l'exosome.

L'invention concerne également un procédé de préparation d'exosomes dérivés de cellules tumorales tels que définis ci-dessus, comprenant les étapes de centrifugation différentielle de fractions membranaires de surnageants de culture ou de lysats de cellules tumorales ou de suspensions tumorales fraîches et de récupération de la ou des fraction(s) contenant lesdits exosomes.

Le procédé de l'invention ne fait pas intervenir de détergents (qui détruiraient les exosomes en dissolvant - en solubilisant les membranes) tels que NP40, SDS, Triton-X-100.

Le procédé de l'invention ne fait pas intervenir de filtration à travers une membrane (Millipore par exemple).

Ce procédé est décrit par exemple dans Raposo et *al.*, J. Exp. Med. 1996, 183:1161-1172.

La fraction membranaire contenant les exosomes de surnageants est celle obtenue après ultra-centrifugation à 70 000 xg.

Quant aux lysats de culture, ils proviennent de pièces tumorales opératoires après excision chirurgicale (1er cas) ou bien d'organe porteur de tumeur (organe

excisé chirurgicalement) (2ème cas), que l'on traite par dissociation mécanique (1er cas) ou par perfusion prolongée (2ème cas).

La suspension cellulaire finale est traitée de la même manière que les surnageants de culture.

5 Il peut aussi s'agir de cellules traitées par congélation/décongélation en plusieurs cycles successifs.

L'invention concerne également les exosomes susceptibles d'être obtenus selon le procédé décrit ci-dessus.

10 Selon un mode de réalisation avantageux, le procédé de l'invention de préparation d'exosomes dérivés de cellules tumorales tels que définis ci-dessus est tel que l'étape de centrifugation est effectuée :

- sur un prélèvement de sang efférent de la veine de l'organe tumoral isolé, ou
- sur un prélèvement de sérum ou de plasma du sang circulant d'un patient, ou
- à partir du produit de drainage (sérum physiologique contenant
- 15 éventuellement de la dexaméthasone, ou agent cytotoxique stimulant l'exocytose des exosomes) d'un organe excisé chirurgicalement et traité *ex vivo* par circuit isolé-perfusé pour le drainage de la tumeur qu'il porte, ou
- à partir du surnageant d'un explant tumoral dissocié *in vitro*.

20 Le prélèvement de sang efférent de l'organe tumoral isolé correspond à 20 à 50 ml de sang de la veine principale efférente de l'organe tumoral, prélevé avant l'intervention d'ablation chirurgicale.

Le produit de drainage d'un organe excisé chirurgicalement et traité *ex vivo* par circuit isolé-perfusé a lieu de la façon suivante.

25 Dans le cas d'organe présentant une artère afférente et une veine efférente, on caractérise l'artère par une tubulure plastique branchée à une poche proclive contenant du sérum physiologique avec éventuellement d'autres agents. On draine l'organe et le liquide ressort par une autre tubulure cathétérisant la veine, en déclive (par exemple dans le cas du cancer du rein, ou d'un glioblastome cérébral).

30 La dexaméthasone, contenue éventuellement dans le produit de drainage, a pour but d'augmenter le stress cellulaire et l'exocytose des exosomes hors de la cellule tumorale.

Le surnageant d'un explant tumoral dissocié *in vitro* est obtenu de la façon suivante :

- on procède à la dissociation mécanique de la tumeur conduisant à une
- 35 suspension unicellulaire contenant des cellules tumorales et des cellules du stroma tumoral et des cellules du système immunitaire ; cette suspension peut être irradiée et récupérée pour les ultra-centrifugations différentielles.

Un procédé avantageux de préparation selon l'invention d'exosomes dérivés de cellules tumorales est effectué :

* soit à partir de cultures de cellules tumorales et comprenant

• une irradiation, à une intensité suffisante pour provoquer l'action
5 cytotatique des cellules tumorales et ne dépassant pas 15.000 rads avantageusement à environ 10.000 rads, des cellules tumorales avant, pendant ou après leur mise en culture, ou

• un traitement, pendant la culture, des cellules tumorales, à l'aide de
10 stéroïdes, par exemple dexaméthasone, ou d'agents cytotoxiques, par exemple 5-fluorouracile (5 Fu) ou cis-platinum, docetaxel, anthracycline, poison du fuseau, antipyrimidique, ou d'interleukine par exemple IL10, IL2, IL15, GM-CSF, IFN γ , IL-6,

• un traitement avec un agent susceptible d'augmenter la quantité
15 d'endosomes multivésiculaires, par exemple le nocodazole (Gruenberg J. *et al.* (1989) "Characterization of the Early Endosome and Putative Endocytic Carrier Vesicles In Vivo and with an Assay of Vesicle Fusion In Vitro" The Journal of Cell Biology 108:1301-1316) et donc d'augmenter la production d'exosomes,

* soit à partir d'un prélèvement de sérum physiologique drainant un
20 organe excisé chirurgicalement et traité *ex vivo* par circuit isolé-perfusé pour le drainage de la tumeur qu'il porte, ou

* soit à partir du surnageant d'un explant tumoral dissocié *in vitro* et
comportant

• un traitement à l'aide de stéroïdes, par exemple dexaméthasone, ou
25 d'agents cytotoxiques, par exemple 5-fluorouracile (5 Fu), cis-platinum, taxanes, ou d'interleukine par exemple IL-10, IL-2, GM-CSF, etc...

S'agissant de l'irradiation, elle doit être suffisante pour provoquer l'action
cytotatique des cellules tumorales.

L'irradiation des cellules tumorales peut être faite avant la mise en culture des
cellules, ou pendant ou après la mise en culture des cellules tumorales.

30 Il faut irradier quand les cellules tumorales sont vivantes, c'est-à-dire :

- soit sur l'organe excisé porteur de tumeur avant la perfusion,

- soit sur les cellules en culture,

- soit sur la suspension cellulaire dissociée mécaniquement ; mais, dans tous les
cas, avant souffrance cellulaire tumorale pour cause d'hypoxie/nécrose
35 vasculaire/déshydratation.

S'agissant du traitement à l'aide de stéroïdes, il permet de provoquer une
activation cellulaire conduisant à l'exocytose des exosomes.

S'agissant du traitement à l'aide d'agents cytotoxiques, il permet de :

- modifier le cytosquelette et réarranger les compartiments intracellulaires pour dérégler les phénomènes d'internalisation et d'exocytose (1er cas),
- dépolymériser les microtubules (2ème cas).

S'agissant du traitement avec un agent susceptible d'augmenter la quantité
5 d'endosomes multivésiculaires, il a lieu pendant la mise en culture des cellules, comme agent on peut citer le nocodazole (1er cas), (drogue permettant de dépolymériser les microtubules), la bafilomycine (2ème cas) (drogue inhibant les ATPases vacuolaires) ("Bafilomycins: A class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells" (1988) Proc. Natl. Acad. Sci.
10 USA 85:7972-7976),

L'invention a notamment pour objet un procédé de préparation d'exosomes de cellules tumorales tel que défini ci-dessus, comprenant

- soit la modification génétique des cellules tumorales par des gènes exogènes codant pour des molécules de classe I et/ou de classe II du complexe majeur
15 d'histocompatibilité (CMH), et/ou des gènes codant pour des antigènes caractérisés de tumeurs et/ou des gènes codant pour des molécules de co-stimulation/adhésion ou des chemokines attractantes, les produits de ces gènes exogènes pouvant se trouver exprimés à la surface des exosomes et/ou être séquestrés à l'intérieur des exosomes,
- soit la modification *in vitro* des exosomes produits par les cellules
20 tumorales, telle que l'introduction (par électroporation, par fusion avec un liposome synthétique, par virus recombinant ou par méthode chimique), de protéines ou d'acides nucléiques ou médicaments pharmaceutiquement définis dans et/ou avec les exosomes.

Les exosomes des cellules tumorales transfectées comme indiqué ci-dessus sont
25 recueillis et utilisés comme vaccins tumoraux.

Les exosomes modifiés *in vitro* comme indiqué ci-dessus sont destinés à délivrer le matériel exogène à une cellule cible *in vitro* ou *in vivo*.

S'agissant de la fusion avec un liposome synthétique, ce procédé est réalisé comme indiqué dans Nabel *et al.* (1996), ou dans Walker *et al.* (1997. Nature 387,
30 pages 61 et suivantes).

L'invention concerne également des cellules présentatrices d'antigènes, notamment lymphocytes B, macrophages, monocytes ou cellules dendritiques, chargées en exosomes dérivés de cellules tumorales tels que définis ci-dessus.

Dans ce qui suit, on utilisera l'expression "cellules présentatrices d'antigènes
35 chargées en exosomes dérivées de cellules tumorales" ou "cellules présentatrices d'antigènes sensibilisées par des exosomes dérivées de cellules tumorales".

Les cellules présentatrices d'antigènes de l'invention ont notamment les caractéristiques suivantes :

- dans des modèles de tumeurs qui n'expriment pas des molécules de classe I et qui, par conséquent, n'ont pas la capacité de stimuler des cellules T CD8+, des cellules dendritiques chargées avec des exosomes de cellules tumorales, peuvent présenter ces peptides tumoraux à des cellules T cytotoxiques dans le contexte des molécules de classe I du CMH, (caractéristique n° 1)

- des cellules dendritiques chargées d'exosomes de cellules tumorales injectées en intraveineuse ou en sous-cutanée sont également très efficaces (caractéristique n° 2)

Un test permettant de mettre en évidence la caractéristique n° 1 est le suivant.

Dans le système murin où la tumeur est classe I négative, les exosomes sont eux aussi dépourvus en molécules de classe I du CMH, mais peuvent, lorsqu'ils sont incubés et chargés sur les cellules dendritiques, médier une réponse immunitaire anti-tumorale. Seuls, en injection intradermique, ils ne le peuvent pas.

Un test permettant de mettre en évidence la caractéristique n° 2 est le suivant.

Dans le système humain, un exosome de classe I du CMH négatif, incubé en présence d'une cellule dendritique classe I du CMH positive, peut permettre la stimulation de clones CD8+T spécifiques de l'antigène contenu dans l'exosome (voir figure 7).

L'invention concerne également un procédé de préparation de cellules présentatrices d'antigènes telles que définies ci-dessus, comprenant les étapes d'incubation de cellules présentatrices d'antigènes en présence d'exosomes dérivés de cellules tumorales tels que définis ci-dessus et de récupération des susdites cellules présentatrices d'antigène chargées du susdit exosome de cellules tumorales.

L'invention concerne également des cellules présentatrices chargées en exosomes dérivés de cellules tumorales et susceptibles d'être obtenues par le procédé décrit ci-dessus.

L'invention concerne également une vésicule membranaire débarrassée de son environnement naturel, sécrétée par des cellules présentatrices d'antigène chargées en exosomes dérivés de cellules tumorales tels que définis ci-dessus.

Pour obtenir ces vésicules membranaires définies ci-dessus, on peut avoir recours à un procédé comprenant :

- une étape de préparation d'un exosome dérivé de cellules tumorales tel que défini ci-dessus,

- une étape d'incubation d'un exosome dérivé de cellules tumorales avec des cellules présentatrices d'antigène,

- une étape de centrifugation différentielle de fractions membranaires de surnageants de culture ou de lysats des susdites cellules présentatrices d'antigènes, chargées en exosomes et

- une étape de récupération de la fraction contenant les susdites vésicules tumorales.

L'invention a également pour objet des vésicules membranaires telles que définies ci-dessus et susceptibles d'être obtenues selon le procédé décrit ci-dessus.

5 L'invention a également pour objet l'utilisation d'exosomes dérivés de cellules tumorales tels que définis ci-dessus, pour la sensibilisation de cellules présentatrices d'antigènes, notamment lymphocytes B, macrophages, monocytes ou cellules dendritiques.

L'invention a également pour objet l'utilisation :

10 - d'exosomes dérivés de cellules tumorales tels que définis ci-dessus, ou
- de cellules présentatrices d'antigènes telles que définies ci-dessus, ou
- de vésicules membranaires telles que définies ci-dessus, pour la stimulation et éventuellement l'amplification *in vitro* de lymphocytes T spécifiques d'antigènes, contenues dans les susdits exosomes, ou les susdites cellules
15 présentatrices d'antigènes ou les susdites vésicules membranaires, - ou de lymphocytes B, et notamment pour la stimulation et l'amplification *in vitro* de lymphocytes T.

L'invention concerne l'utilisation d'exosomes dérivés de cellules tumorales, ou de vésicules membranaires provenant de cellules présentatrices d'antigènes sensibilisées par les exosomes tumoraux pour l'expansion *in vitro* ou *ex vivo* d'un ou
20 plusieurs répertoires de lymphocytes T susceptibles de reconnaître les peptides tumoraux dans le contexte CMH classe I exprimés à la surface des exosomes ou des vésicules membranaires.

De même, les exosomes tumoraux ou les vésicules membranaires peuvent être utilisés pour sensibiliser des cellules présentatrices d'antigènes qui sont, elles-mêmes,
25 utilisées pour permettre l'expansion de ces répertoires, par l'intermédiaire des antigènes tumoraux re-apprêtés et présentés dans le contexte CMH classe I.

L'invention a pour objet un médicament contenant à titre de substance active un exosome dérivé de cellules tumorales tel que défini ci-dessus, ou une cellule présentatrice d'antigène chargée en exosome telle que définie ci-dessus, ou une
30 vésicule membranaire telle que définie ci-dessus, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

Comme forme galénique appropriée, les exosomes peuvent être contenus dans du sérum physiologique, dans une ampoule stockée à -80°C.

Un mode d'administration approprié des médicaments de l'invention est
35 constitué par des injections intradermiques ou sous-cutanée, notamment lorsque la substance active du médicament est constituée par des cellules dendritiques chargées en exosomes.

Les posologies appropriées seraient de l'ordre de 10 à 300, et notamment 10 à 100 $\mu\text{g}/60$ kg de poids corporel et de 10 μg pour les tests de réaction intradermiques.

Les médicaments de l'invention peuvent être également utilisés à raison de 100 μg pour les traitements de vaccinations prophylactiques.

5 Les objectifs visés par l'utilisation des médicaments de l'invention sont :

- l'hypersensibilité retardée (tests chez les cancéreux), ou

- la thérapie prophylactique, ou

10 - l'utilisation dans le cadre de la détection de la fréquence des précurseurs lymphocytaires spécifiques cytotoxiques ou sécréteurs d'interféron par la technique de dilution limite.

Il s'agit d'utiliser les cellules dendritiques autologues ou allogéniques préincubées avec les exosomes tumoraux de l'invention, comme cibles de lymphocytes périphériques de sujets porteurs de la tumeur, avant, pendant et après traitement antitumoral (traitement classique ou immunisation active spécifique).

15 L'invention concerne également l'utilisation d'un exosome dérivé de cellules tumorales tel que défini ci-dessus, ou d'une cellule présentatrice d'antigène chargée en exosome telle que définie ci-dessus, ou d'une vésicule membranaire telle que définie ci-dessus, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de tumeurs, solides et hématopoïétiques.

20 L'invention concerne également l'utilisation d'un exosome dérivé de cellules tumorales telles que définies ci-dessus ou d'une cellule présentatrice d'antigène chargé en exosome telle que définie ci-dessus, ou d'une vésicule membranaire telle que définie ci-dessus dans le cadre d'un test d'hypersensibilité retardée du cancer ou encore comme outil diagnostique de recherche de fréquence de précurseurs lymphocytaires spécifiques cytotoxiques.

25 Comme tumeurs solides, on peut citer : le cancer du rein, du sein, les mélanomes, sarcomes, etc...

Comme tumeurs hématopoïétiques, on peut citer : les leucémies, les lymphomes malins hodgkiniens ou non hodgkiniens.

30 L'invention concerne également l'utilisation d'un exosome dérivé de cellules tumorales, ou d'une fraction ou d'un composant constitutif d'un exosome dérivé de cellules tumorales tel que défini ci-dessus, ou d'une vésicule membranaire telle que définie ci-dessus, pour l'amélioration de l'efficacité d'un liposome synthétique pour le transfert de matériel biologique dans une cellule *in vitro* ou *in vivo*.

35 L'invention concerne également la création d'une banque d'exosomes dérivés de cellules tumorales de type histologique commun ou différent.

Celles-ci sont composées de mélanges d'exosomes faits à partir de lignées de cellules tumorales pour un type de cancer donné. Ces banques d'exosomes peuvent

permettre de sensibiliser des cellules présentatrices d'antigène, notamment des cellules dendritiques, contre toutes les tumeurs de ce type.

L'invention concerne également des mélanges d'exosomes.

On peut citer par exemple des mélanges d'exosomes tumoraux pour des tumeurs génétiquement reliées (cancer du sein et de l'ovaire) ou présentant des mutations p53, p16 connues (cancer du sein, sarcome).

On peut également mentionner des mélanges d'exosomes tumoraux avec des exosomes provenant de cellules immortalisées et transfectées pour exprimer des molécules de co-stimulation, des molécules d'adhésion, des chemokines attractantes (qui ne sont pas normalement exprimées sur les exosomes tumoraux sauf exception).

Tableau 1. Production d'exosomes par des lignées de cellules tumorales murines et humaines

Lignées de cellules tumorales	Exosomes ($\mu\text{g}/2 \times 10^8$ cellules/18 h)
Murines	
MCA101	172
P815	163
MC38	120
L1210	150
TS/A	160
Humaines (mélanomes)	
VIO*	80
FON	90
MZ2-2	18
Humaines (néphromes)	
RCC NUN*	120
RCC JOUA*	18
RCC MEG*	10
RCC GIAM*	100

Les cellules de lignées tumorales ont été incubées pendant 24 h à une densité de un million de cellules par millilitre. Les exosomes ont ensuite été préparés (voir exemple) à partir des milieux de culture par ultra-centrifugation différentielle. La concentration en protéines exosomales est mesurée par le test de Bradford (BioRad Protein Assay [BioRad]).

MZ2-2 est décrite dans Traversari *et al.* (1992).

Les * signifient que les différentes lignées primaires ont été établies et caractérisées dans le laboratoire de biologie clinique de l'Institut Gustave Roussy et sont accessibles sur demande.

LEGENDES DES FIGURES

Figures 1A et 1B. Morphologie des endosomes multi-vésiculaires et des exosomes dérivés de cellules TS/A.

A. Sections ultrafines des cellules TS/A analysées par microscopie électronique. Détail du cytoplasme montrant un compartiment endosomal contenant des vésicules de 60-80 nm de diamètre.

B. Préparation d'exosomes de cellules TS/A analysées en microscopie électronique par la technique sur vésicule intacte (Raposo *et al.* (1996). Les préparations d'exosomes contiennent une population majoritaire de vésicules de 60-80 nm de diamètre, de taille et morphologie similaires aux vésicules internes des endosomes multivésiculaires montrés en A.

Figures 2A et 2B. Présence de différents marqueurs de la voie endocytyque dans les exosomes de cellules tumorales.

A. Deux microgrammes de protéines exosomales (Exos) ou 2×10^5 cellules tumorales ont été analysés par Western blot à l'aide d'anticorps monoclonaux spécifiques de : molécules de classe I du CMH (Machold Robert P. *et al.* (1995) "Peptide Influences the Folding and Intracellular Transport of Free Major Histocompatibility Complex Class I Heavy Chains" J. Exp. Med. 181:1111-1122), récepteur de la transferrine (TfR)(anticorps correspondant étant H68.4 décrit dans Biochimica et Biophysica Acta (1992) 1136(1):28-34), Lamp 1 et 2 (rat anti-mouse monoclonal antibodies, Pharmingen) et Calnexine (Hebert Daniel N. *et al.* (1995) "Glucose Trimming and Reglycosylation Determine Glycoprotein Association with Calnexin in the Endoplasmic Reticulum" Cell 81:425-433).

B. Dix microgrammes de protéines exosomales d'une lignée de cellules de mélanome (FON) ou 10 μ g. de protéines totales des mêmes cellules ont été analysés par Western blot à l'aide d'un anticorps anti-MART-1 (Marincola F. *et al.* (1996) "Analysis of expression of the melanoma associated antigens MART-1 and gp100 in metastatic melanoma cell lines and in "in situ" lesions" Journal of Immunotherapy 19:192-205).

Figure 3. Les exosomes dérivés d'une lignée tumorale MART-1 positive (FON) stimulent un clone T spécifique de MART-1.

Vingt mille cellules du clone T LT8 (ou LT12, résultats non montrés) ont été incubées avec des exosomes dérivés de FON (lignées de cellules MART-1 et HLA-A2 positive) ou GIAM (cellules d'une lignée de néphrome, MART-1 négative) comme
 5 contrôle négatif pendant 48 h. La production de $\text{TNF}\beta$ par les cellules du clone T a été mesurée par essai biologique avec les cellules WEHI (Espavik *et al.*). Les exosomes induisent la production d' $\text{IFN}\gamma$ par le clone T, révélant ainsi la présence de complexes HLA-A2/peptide dérivés de MART-1 à la surface des exosomes.

- 10 - "LT8+TexGIAM" correspond à des clones T LT8 incubés en présence d'exosomes dérivés de cellules tumorales GIAM ;
- "LT8+TexFON" correspond à des clones T LT8 incubés en présence d'exosomes dérivés de cellules tumorales FON ;
- 15 - "LT8+TumFON" correspond à des clones T LT8 incubés en présence de cellules tumorales FON.

En abscisses, on a représenté les cellules conditionnées et en ordonnées la quantité produite de $\text{TNF}\beta$ (pg/ml).

Figure 4. Les exosomes de cellules P815 exprimant la βGal stimulent des splénocytes de souris immunisées par des adénovirus βGal recombinants.

Des splénocytes (10^5) de souris BALB/c immunisées 2 mois avant avec 10^6 pfu adénovirus recombinant βGal ayant rejeté une tumeur exprimant βGal ont été incubés avec des exosomes dérivés des cellules P815 (diamants vides) ou des cellules P815- βGal (carrés pleins ■). Les splénocytes non incubés en exosomes donnent le bruit de
 25 fond symbolisé par des points pleins (●). Après 5 jours de culture, 1 μCi de thymidine tritiée a été ajouté par puits de culture. L'incorporation de tritium dans l'ADN cellulaire a été mesurée 18 h plus tard. Les résultats significativement différents d'après la méthode exacte de Fisher sont marqués *.

En abscisses, on a représenté la quantité en exosomes dérivés des cellules tumorales P815 ($\mu\text{g/ml}$) et en ordonnées les coups par minute (CPM).
 30

Figure 5. L'antigène tumoral MART-1 contenu dans des exosomes peut être présenté aux lymphocytes T par des cellules dendritiques.

Des exosomes à doses croissantes dérivés des lignées de cellules tumorales FON (MART-1+, HLA-A2+, A1-) et MZ2-2 (MART-1+, HLA-A2-, A1+) ont été incubés avec les clones (20 000 cellules par puits (plaques de 96 puits) T LT12 (spécifique de HLA-A2/peptide de MART-1) en présence de cellules dendritiques HLA-A2+ dérivées de macrophages circulants (DCA2) (Sallusto, F. and
 35

Lanzavecchia A., 1994, Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by GM-CSF et IL-4 and down regulated by TNF α . J. Exp. Med. 179:1109-1118). La sécrétion d'IFN γ représentée en ordonnées (pg/ml) a été mesurée dans les surnageants de culture après 2 jours. Les exosomes dérivés de FON, ainsi que ceux dérivés de MZ2-2, ont induit la sécrétion d'IFN γ par LT12 et LT8 (résultats non montrés). Les cellules FON ont aussi induit une forte sécrétion d'IFN γ par les clones T, alors que les cellules MZ2-2, qui n'expriment pas l'haplotype de molécule HLA adéquate (HLA-A2), n'ont pas induit de production d'IFN γ .

- "LT12+DCA2" correspond à des clones T LT12 incubés en présence de cellules dendritiques HLA-A2+ ;

- "LT12+DCA2+TexFON" correspond à des clones T LT12 incubés en présence de cellules dendritiques sensibilisées par les exosomes dérivés de cellules tumorales FON ;

- "LT12+DCA2+TexMZ2" : correspond à des clones TL12 incubés en présence de cellules dendritiques sensibilisées par les exosomes dérivés de cellules tumorales MZ2-2.

Figures 6A et 6B. Effets anti-tumoraux des exosomes *in vivo*.

Cent mille cellules tumorales TS/A ont été injectées par souris BALB/c (A) ou Nude (B). Trois jours plus tard, chaque souris a reçu deux injections successives, à 24 h d'intervalle (représentées par J3 et J4 sur la figure), de 20 μ g à 30 μ g d'exosomes en intradermique. La taille des tumeurs a ensuite été mesurée deux fois par semaine. Les analyses statistiques ont été faites par la méthode exacte de Fisher (la significativité à 95% est indiquée par une *).

A. Deux groupes de 5 souris ont reçu des exosomes dérivés de TS/A (triangles pleins \blacktriangle) ou de MCA38 (triangles vides \triangle) (une lignée de cellules d'adénocarcinome de colon dérivé d'une souris C57BL/6), comme contrôle négatif. Seuls les exosomes dérivés de TS/A ont un effet anti-tumoral *in vivo*.

B. Deux groupes de souris Nude (d'halotype H2^d, fond génétique BALB/c) ont reçu en parallèle les mêmes doses des mêmes préparations d'exosomes (\blacksquare : exosomes de TS/A; \square : exosomes de MC38). Aucun effet anti-tumoral n'a été observé sur les souris Nude. Les lymphocytes T sont donc nécessaires aux effets anti-tumoraux des exosomes *in vivo*.

En abscisses, on a indiqué les jours et en ordonnées la taille moyenne de la tumeur (mm²).

Figure 7. Des cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse sensibilisées par les exosomes dérivés de cellules tumorales induisent l'éradication totale *in vivo* de tumeurs solides établies.

Cinq cent mille cellules tumorales P815 ont été injectées dans le flanc droit des souris DBA/2 10 jours avant le traitement. Le traitement a consisté en une seule injection d'exosomes (10 μ g/souris) dans le même flanc, mais à distance de la tumeur. Un autre groupe a été injecté en intraveineux par des cellules dendritiques (dérivée de moelle osseuse par traitement pendant 5 jours en GM-CSF+IL4 (Mayordomo *et al.* 1995), incubées au préalable pendant 3 h avec les exosomes de P815. Les tumeurs ont été mesurées et les résultats analysés comme décrit dans la figure 6. Les exosomes de P815 ont sensibilisé les cellules dendritiques pour induire le rejet des tumeurs établies. Du fait de la faible dose en exosomes injectée en intradermique, les exosomes n'ont pas eu d'effet significatif sur la croissance tumorale. L'insert montre le pourcentage de souris sans tumeur (en ordonnées), la barre pleine correspondant uniquement aux groupes d'animaux de type carrés pleins, l'abscisse correspondant aux jours. Ces souris n'ont pas développé de tumeur après ré-injection du double de la dose tumorale minimum, montrant qu'elles avaient développé une immunité anti-tumorale. Les symboles utilisés dans la figure sont les suivants :

- : cellules dendritiques incubées avec des exosomes témoins,
- : cellules dendritiques incubées avec des exosomes P815,
- ▲ : exosomes P815 en intradermique,
- X : animaux non traités.

En abscisses, on a indiqué les jours et en ordonnées le volume moyen de la tumeur.

Figures 8A, 8B et 8C. Des agents chimiothérapeutiques/cytotoxiques et l'irradiation peuvent stimuler l'exocytose des exosomes tumoraux.

La leucémie murine L1210 et la lignée de cancer du rein primitif humain GIAM ont été utilisées (figure 8C). Deux millions de cellules tumorales ont été incubées en présence de quantités croissantes de 5 Fu (pour L1210) ou de cis-platinum (CDDP) (pour GIAM) par ml pendant 16 heures.

Le surnageant a été récupéré, puis a fait l'objet d'ultra-centrifugations différentielles comme sus-décrit dans le tableau 1.

GIAM a aussi été incubée en IL-2 1000 U/ml, ou en dexaméthasone (10^{-6} M), ou irradiée à 10.000 rads.

Les fortes doses de chimiothérapie et l'irradiation sont de bons exemples de régulation positive d'exocytose des exosomes dans ces modèles tumoraux. Les

résultats ont été retrouvés dans d'autres tumeurs également (figures 8A et 8B) ; en particulier, l'irradiation semble être le stimulus d'exocytose le plus puissant.

La Figure 8A correspond au mélanome FON sus-décrit et la Figure 8B correspond à un thymome murin désigné par EL4 (J. Natl. Cancer Inst. (1972) 48:265-271).

Sur la Figure 8A, on a représenté les cellules FON incubées dans différentes conditions :

1) CM : milieu de culture de base (RPMI contenant 10% de sérum de veau foetal),

2) DXM = en présence de dexaméthasone,

3) irradiation : irradié à 10.000 rads,

4) sans sérum,

5) IL-10 = en présence d'IL-10, à raison de 10 ng/ml.

Les irradiations ci-dessus sont valables également pour les cellules EL4, L1210 et G1AM.

Figures 9A et 9B. Enfin, les vésicules membranaires sortant des cellules présentatrices d'antigènes telles que les dendritiques, après qu'elles aient été chargées par des exosomes tumoraux de mélanomes, sont efficaces pour stimuler les lymphocytes T spécifiques de ces mélanomes.

Sur les figures 9A et 9B :

- LT8 (CM) correspond aux clones T LT8 incubés en milieu de culture de base comme défini à la figure 8A,

- DexTexNUN correspond à l'exosome dérivé de cellules dendritiques chargées en exosomes provenant de cellules tumorales NUN,

- DexTexFON correspond à l'exosome dérivé de cellules dendritiques chargées en exosomes provenant de cellules tumorales FON,

- TumFON correspond aux cellules tumorales FON.

A. Essais de prolifération : les exosomes Fon (utilisés figure 3) ont été incubés avec des cellules dendritiques HLA-A2 pendant 3 heures, lavées en solution saline à 9‰, puis incubées en milieu acide pH 6.3 pendant 18 heures. Les exosomes vésicules membranaires de dendritiques sont ainsi récupérés du surnageant de culture des susdites cellules dendritiques HLA-2.

Les vésicules membranaires (exosomes provenant de cellules dendritiques chargées avec des exosomes de cellules tumorales)(DexTex) sont alors incubées avec les clones LT8 spécifiques de MART-1 présentés dans le contexte HLA-A2 (rappel : les exosomes Fon contiennent l'antigène MART-1). Comme contrôle négatif, les exosomes NUN (lignée de cancer du rein HLA-A2 négative, MART-1 négative) ont

été utilisés. Comme contrôle positif, on a utilisé la lignée tumorale irradiée FON (TumFON) ou l'anticorps anti-CD3, préadsorbé sur plastique (anti-CD3Ab). L'incubation des DexTex avec les clones LT8 dure 48 heures, puis 1 μ Ci de thymidine tritiée est ajouté par puits de 200 μ l. Les proliférations lymphocytaires LT8 sont mesurées 18 heures plus tard.

En ordonnées, on a représenté les coups par minute.

B. Mêmes manipulations, mais l'IFN γ est mesuré dans le surnageant de culture à 48 heures, par ELISA. En ordonnées, on a représenté la concentration en IFN γ (pg/ml).

EXEMPLE

Production d'exosomes par des lignées de cellules tumorales humaines et murines.

G. Raposo *et al.* (1996) ont récemment montré que des lignées de lymphocytes B transformés par le virus d'Epstein Barr sécrètent des vésicules présentatrices d'antigènes, appelées exosomes. Ces vésicules peuvent être isolées à partir des surnageants de culture de ces lignées par ultra-centrifugation différentielle. Dans un premier temps, on a déterminé si différentes lignées de cellules tumorales, murines et humaines, primaires ou établies en culture, sécrètent aussi des exosomes.

Pour ce faire, les cellules tumorales murines ou humaines provenant de leucémies ou de tumeurs solides (rein ou mélanome ou colon) (voir tableau 1) ont été incubées pendant 24 h à une densité de un million de cellules par millilitre. Le milieu de culture (RPMI contenant 10% de sérum de veau foetal) a ensuite été débarrassé des cellules par centrifugation à 300 xg pendant 10 minutes. Les débris cellulaires ont ensuite été éliminés par deux centrifugations successives de 15 min. chacune à 800 xg et une centrifugation de 30 minutes à 9000 xg. Enfin, les exosomes ont été recueillis grâce à une centrifugation de 60 minutes à 100 000 xg, puis lavés une fois en PBS dans les mêmes conditions. La concentration en protéines dans les préparations d'exosomes a été mesurée par la méthode de Bradford (BioRad Protein Assay [BioRad]).

Toutes les lignées tumorales testées, humaines et murines (solides ou hématopoïétiques, primaires ou établies en culture ou provenant de tumeurs fraîches dissociées), produisent des exosomes (Tableau 1). Cependant, les efficacités de production sont variables entre différentes lignées. Les lignées de cellules tumorales murines produisent entre 100 et 200 microgrammes de protéines d'exosomes par 200 millions de cellules en 24 heures. Les lignées humaines de mélanome et de néphrome produisent entre 10 et 100 microgrammes de protéines d'exosomes par 200 millions des cellules en 24 heures.

Les exosomes produits par les cellules tumorales sont d'origine endocytaire.

Afin de déterminer si les exosomes purifiés à partir des surnageants des lignées de cellules tumorales sont d'origine endocytaire, on a réalisé une étude morphologique par microscopie électronique de l'une de ces lignées tumorales, TS/A (lignée de carcinome mammaire de souris) (Nanni P. *et al.* (1983) "TS/A: a new metastasizing cell line originate from a BALB/c spontaneous mammary adenocarcinoma" Clin. Exp. Metastasis 1:373-380). Les cellules tumorales ont été fixées et apprêtées pour la microscopie électronique comme décrit précédemment dans Raposo *et al.* (1996) Les exosomes ont été directement déposés sur les grilles et analysés (Raposo *et al.*, 1996).

La figure 1A montre des exemples des compartiments intracellulaires d'aspect multivésiculaire observés dans les cellules tumorales. Ces compartiments endocytiques ont un diamètre de 200-300 nm (la barre au bas des panneaux A et B représente 200 nm) et sont composés d'une membrane externe entourant de multiples vésicules internes de 60-80 nm de diamètre. Les préparations d'exosomes contiennent une population majoritaire de vésicules de 60-80 nm de diamètre (figure 1B), souvent agrégées, et de morphologie semblable aux vésicules internes des endosomes multivésiculaires observés à l'intérieur des cellules (figure 1A). Ces résultats suggèrent que les exosomes sont sécrétés dans le milieu extracellulaire après fusion de la membrane externe des endosomes avec la membrane cytoplasmique. En effet, de tels profils d'exocytose sont observés dans ces cellules (données non montrées).

Afin de déterminer si les exosomes sont effectivement d'origine endocytaire, on a ensuite effectué une analyse par Immunoempreinte des marqueurs présents définis ci-après dans les exosomes dérivés de deux lignées tumorales, TS/A et P815 (P815 : mastocytome donné par T. Boon, Ludwig Institute, Bruxelles, Belgique) (mastocytome murin). Pour ce faire, deux microgrammes de protéines d'exosomes ou le lysat cellulaire de 200 000 cellules TS/A ont été séparés par gel de polyacrylamide, puis transférés sur une membrane de Nylon (Amersham). La présence éventuelle de différents marqueurs a ensuite été révélée à l'aide d'anticorps spécifiques. Les exosomes de TS/A et de P815 contiennent des molécules de classe I du CMH, ainsi que différents marqueurs de la voie endocytaire (le récepteur de la transferrine, les glycoprotéines lysosomales Lamp 1 et 2) (Figure 1A). Par contre, un marqueur caractéristique du Reticulum Endoplasmique (RE), la calnexine, n'est pas présent dans les préparations d'exosomes, montrant que des membranes de RE ne contaminent pas les exosomes.

Les exosomes produits par une lignée de mélanome contiennent un antigène tumoral cytosolique.

Ces résultats montrent que les exosomes sécrétés par les cellules tumorales correspondent aux membranes internes des endosomes multivésiculaires. Or, ces vésicules intraendosomales se forment par invagination, puis bourgeonnement de la membrane externe des endosomes vers l'intérieur de l'endosome. Ces vésicules intraendosomales et par voie conséquence les exosomes, devraient contenir une fraction de cytosol. Ceci est particulièrement important dans le cadre de l'immunothérapie anti-tumorale, puisqu'un certain nombre d'antigènes tumoraux, y compris MART-1 (l'un des plus étudiés), sont des protéines cytosoliques. On a donc testé la présence de MART-1 dans les exosomes.

Pour ce faire, dix microgrammes de protéines d'exosomes ou le lysat cellulaire de 200 000 cellules d'une lignée de mélanome humain (M10) (T. Hercend, CNTS, Gif-sur-Yvette) ont été analysés par Immunoempreinte, comme précédemment. La présence éventuelle de MART-1 a ensuite été révélée à l'aide d'anticorps spécifiques anti-MART-1 (S. Rosenberg, NCI, Bethesda, U.S.A.). Les exosomes sécrétés par la lignée tumorale FON (mélanome du patient FON provenant de F. Faure, Institut Pasteur, Paris, France) contiennent l'antigène tumoral MART-1. Des expériences de protection à la protéinase K (Sigma) ont montré que l'épitope de MART-1 reconnu par cet anticorps monoclonal est à l'intérieur des exosomes (résultats non montrés).

Cette première partie du travail montre que :

- les cellules tumorales produisent et sécrètent des exosomes,
- que les exosomes sont des vésicules d'origine endosomale comportant une membrane externe où se trouvent différentes molécules membranaires (classe I du CMH, différents marqueurs des endosomes)
- que les exosomes contiennent une fraction de cytosol, y compris des antigènes tumoraux cytosoliques, comme MART-1.

Ces résultats ont amené à rechercher les activités biologiques des exosomes.

Les exosomes peuvent stimuler des lymphocytes T CD8 *in vitro*.

Puisque les exosomes portent des molécules de classe I à leur surface, on a testé s'ils sont capables de stimuler des lymphocytes T CD8. On a utilisé deux clones T, LT8 et LT12 donnés par Faure F., Institut Pasteur, Paris, France, reconnaissant un peptide dérivé de MART-1 en association avec HLA-A2 (Dufour *et al.* 1997). A cette fin, puisque les cellules tumorales FON sont HLA-A2, on a incubé les cellules des clones T LT8 ou LT12 avec des exosomes préparés à partir de surnageants de FON, ou, en guise de contrôle positif, des cellules FON intactes. L'activation des lymphocytes T a été mesurée par la sécrétion de TNF β . Les exosomes de FON ont

induit la sécrétion de $\text{TNF}\beta$ par LT8 et LT12 d'une façon dose-dépendante avec une activité notée entre 0.5 et 2.5 $\mu\text{g/ml}$ d'exosomes. A plus forte dose, des effets toxiques ont été notés (données non montrées)(Figure 3). Les cellules FON ont aussi induit une sécrétion de $\text{TNF}\beta$, alors que des exosomes dérivés de cellules tumorales n'exprimant pas MART-1 ne le font pas (Figure 3). Donc, des complexes HLA-A2/peptide de MART-1 sont présents à la surface des exosomes.

Des résultats similaires ont été obtenus chez la souris avec des lymphocytes T de rate d'une souris immunisée par la β -galactosidase (β -gal).

Des exosomes ont été produits à partir de surnageants de cellules de mastocytome P815 ou de cellules P815 exprimant la β -gal (lignées de A. Albina, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France), ou de cellules d'une autre tumeur (L1210 leucémie murine H2^d) n'exprimant pas la β -gal, L210. Des concentrations croissantes (0,3 $\mu\text{g/ml}$ à 20 $\mu\text{g/ml}$) de ces différentes préparations d'exosomes ont ensuite été incubées pendant 4 jours avec des cellules spléniques de souris immunisées par la β -gal exprimée dans un adénovirus recombinant. Seuls les exosomes de cellules P815 (à la plus forte concentration de 20 $\mu\text{g/ml}$) exprimant la β -gal ont induit une prolifération significative (voir figure 4) (mesurée par l'incorporation de thymidine tritiée), bien que peu forte, des cellules spléniques. Ces résultats montrent que les exosomes produits par les cellules P815 exprimant la β -gal portent à leur surface des complexes H2^d/peptides dérivés de β -gal et sont capables d'activer des lymphocytes T murins.

Les exosomes peuvent délivrer des antigènes cytosoliques qu'ils contiennent à des cellules présentatrices d'antigènes.

On a ensuite testé la possibilité que des antigènes tumoraux contenus dans les exosomes puissent être apprêtés par des cellules présentatrices d'antigènes pour être présentés aux lymphocytes T.

Dans ce but, on a utilisé les clones T LT8 et LT12 reconnaissant spécifiquement un peptide dérivé de MART-1 (MART-127-35=AAGIGILTV, Dufour E. *et al.*, Diversity of the cytotoxic melanoma-specific immune response. J. Immunol. 1997, 158:3787-3795) en association avec HLA-A2. On a montré que les exosomes produits par la lignée de mélanome humain FON (qui est HLA-A2) contiennent l'antigène tumoral MART-1 (voir Figure 2) et sont capables d'activer directement les clones LT8 et LT12. Afin de disposer d'exosomes contenant aussi MART-1, mais incapables de stimuler directement les clones LT12 et LT8, on a utilisé la lignée de mélanome MZ2-2 (T. Boon, Ludwig Institute, Bruxelles, Belgique), MART-1 positive mais exprimant un autre élément de restriction que HLA-A2 (HLA-A1 en l'occurrence). En effet, les cellules MZ2-2, ainsi que les exosomes dérivés de ces cellules, n'activent

pas les clones LT8 et LT12 (résultats non montrés), contrairement aux cellules FON et aux exosomes dérivés de ces cellules (Figure 3). Par contre, quand ces mêmes exosomes dérivés de MZ2-2 sont incubés en présence de cellules dendritiques exprimant HLA-A2, une stimulation des clones T LT12 et LT8 est observée, comme dans le cas des exosomes dérivés de FON (figure 5).

Dans le cas des exosomes dérivés de MZ2-2, l'activation des clones T ne peut pas être due à des complexes HLA-A2/peptide dérivés de MART-1 préexistants, puisque elles n'expriment pas l'élément de restriction adéquat (HLA-A2). Par conséquent, il ne peut s'agir que de l'antigène contenu dans les exosomes qui a été repris par les cellules présentatrices d'antigènes, dégradé en peptides qui se sont ensuite associés aux molécules HLA-A2 de la cellule présentatrice. Les exosomes permettent donc le transfert d'un antigène entre une cellule tumorale et une cellule présentatrice d'antigènes. Les exosomes ont donc une fonction semblable à celle de "liposomes naturels".

Les exosomes induisent la régression de tumeurs solides établies *in vivo*.

Enfin, puisque les exosomes sont capables de stimuler des lymphocytes T *in vitro* et de sensibiliser des cellules dendritiques pour l'activation de lymphocytes T spécifiques de tumeurs, on a testé l'activité anti-tumorale des exosomes *in vivo*.

Pour analyser une telle activité anti-tumorale, on a injecté à des souris avec deux fois (10^5) la dose tumorigène minimale de cellules tumorales d'une tumeur mammaire (cellules TS/A d'haplotype H2^d, syngéniques de cellules BALB/c) dans le flanc. Après 3 ou 4 jours, les animaux ayant des tumeurs établies ont été injectés deux fois (jour 3 et 4) avec des exosomes préparés à partir de surnageants de cellules TS/A ou comme contrôle négatif des exosomes de cellules MC38 (S. Rosenberg, NCI, Bethesda, U.S.A.) (cellule tumorale d'haplotype H2^b) ou un volume similaire de PBS. La taille moyenne des tumeurs dans le groupe de souris inoculées avec des préparations d'exosomes de TS/A est très diminuée en comparaison avec les groupes de souris contrôle. Cet effet anti-tumoral est dépendant des cellules T, car des souris Nude (souris mutantes dépourvues de lymphocytes T) portant la tumeur et inoculées de façon similaire avec des préparations d'exosomes, ne montrent pas de diminution de la masse tumorale (Figure 6B).

Dans cette même série d'expériences, on a observé un effet anti-tumoral des exosomes préparés à partir de cellules de mastocytome P815 d'haplotype H2^d ce qui permet de penser que ces deux tumeurs expriment des antigènes communs. Des résultats similaires ont été obtenus avec un autre modèle tumoral très immunogénique, le mastocytome P815 (syngénique de souris DBA/2 et d'haplotype H2^d). Dans ce modèle, on a montré que des exosomes injectés en intradermique dans le flanc d'une

souris portant une tumeur (P815) établie au 10ème jour (tumeur mesurant 80-100 mm²) ont la capacité de mener à l'éradication de la tumeur dans plus de 60% des cas. De plus, ces souris montrent une immunité anti-tumorale à long terme (résultats non montrés). Dans cette série d'expériences, on a observé des effets anti-tumoraux d'exosomes préparés à partir de lymphocytes L1210 isolés à partir d'une leucémie murine d'haplo type H2^d et de cellules TS/A, ce qui indique que des épitopes communs existent également entre ces trois tumeurs (entre P815 et TS/A, p53 mutée est commune aux deux tumeurs).

Deux mécanismes pourraient être à la base de l'effet anti-tumoral des exosomes.

Tout d'abord, une fois injectés, les exosomes pourraient activer directement les lymphocytes T de l'hôte, spécifiques de la tumeur. De cette façon, une expansion clonale de lymphocytes T spécifiques de la tumeur ou un "priming" de cellules T pourrait avoir lieu. Une deuxième hypothèse implique une interaction directe des exosomes injectés avec les cellules dendritiques de l'hôte. Ceci pourrait alors stimuler la réponse anti-tumorale. Afin de vérifier cette deuxième hypothèse, on a suivi la croissance de tumeurs dans des souris injectées en intraveineuse avec des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse chargées avec des exosomes de cellules tumorales. Des souris DBA/2 (IFFA CREDO, Orléans, France) ont ainsi été injectées avec deux fois (5×10^5) la dose tumorigène minimale de cellules de mastocytome P815. Dix jours après, chaque animal a été injecté avec 5×10^5 cellules dendritiques chargées, et de ce fait sensibilisées, avec 9 µg d'exosomes. La taille moyenne des tumeurs dans ces conditions diminue de façon significative en comparaison avec des groupes de souris injectées avec du PBS ou avec des cellules dendritiques chargées d'exosomes de cellules d'une tumeur contrôle MC38. En effet, plus de 60% des animaux traités ne présentent plus de tumeur à la fin de l'expérience. De plus, des récives n'ont pas été observées à long terme (dans 80% à 100% des cas). Il est intéressant de constater qu'une telle dose sous-optimale d'exosomes injectée en intradermique n'a pas d'effet, ce qui suggère que les cellules dendritiques peuvent préparer les exosomes contenant les antigènes tumoraux de façon plus efficace que les cellules dendritiques du derme ou les cellules de Langerhans. On a obtenu des résultats similaires avec le modèle de cellules de la tumeur du sein TS/A.

Les résultats obtenus dans le cadre de l'invention montrent que les exosomes de cellules tumorales sensibilisent les cellules dendritiques de façon efficace. Ces cellules, ainsi sensibilisées, ont la capacité d'induire des réponses anti-tumorales puissantes *in vivo*, et cela dans le cas de différentes tumeurs. Ces résultats suggèrent que les effets anti-tumoraux observés après l'inoculation directe d'exosomes *in vivo* sont dus à la sensibilisation des cellules dendritiques de l'hôte. D'une façon remarquable, l'effet est observé après une seule injection de cellules dendritiques

sensibilisées. La majorité des souris traitées montrent une régression tumorale complète ou une survie prolongée (de 60 jours contre 20 jours dans le contrôle) due à la régression tumorale.

Les vésicules membranaires de cellules présentatrices d'antigène, les cellules dendritiques qui ont été incubées avec les exosomes tumoraux, constituent des vésicules immunogènes puissantes pour l'immunisation antitumorale. Elles apportent l'avantage d'éviter l'étape d'injection *in vivo* des cellules dendritiques entières dont elles proviennent. En effet, la thérapie cellulaire dendritique n'offre pas la certitude du phénotype stable de la cellule injectée. En administrant un produit stable sécrété par ces cellules, c'est-à-dire les vésicules membranaires sus-décrites, on offre à l'hôte porteur de tumeurs une garantie d'efficacité et de pouvoir immunisant. Ainsi, on montre sur la figure 9 que 0,6 μg de ces vésicules membranaires, appelées DexTexFON (c'est-à-dire exosome provenant de cellules dendritiques incubées avec des exosomes provenant de cellules tumorales FON), permettent de stimuler directement la prolifération et la sécrétion d'IFN γ de clones LT8 spécifiques de MART-1 et c'est ce que ne peut pas faire 0,6 μg d'exosomes provenant de cellules dendritiques incubées avec des exosomes de cellules tumorales NUN : DexTexNUN (NUN étant une tumeur du rein, HLAA2 négative, MART-1 négative).

La méthode de sensibilisation des cellules présentatrices de l'invention possède différents avantages par rapport aux méthodes de l'art antérieur :

i) elle ne nécessite pas la connaissance préalable d'antigènes tumoraux ; ceci est particulièrement important puisque des antigènes tumoraux ne sont pas connus dans la très grande majorité des tumeurs ;

ii) le procédé de l'invention peut être appliqué à n'importe quelle tumeur produisant des exosomes ; sur plus de 15 lignées de cellules tumorales testées à ce jour, une seule ne produit pas d'exosomes (une des six lignées de mélanome testées).

iii) cette méthode ne dépend pas de l'haplotype du CMH du patient et des cellules tumorales, puisque les antigènes tumoraux présents dans les exosomes sont re-apprêtés et présentés aux lymphocytes T par les molécules du CMH des cellules présentatrices d'antigènes du patient ;

iv) le procédé de l'invention peut en principe être efficace entre tumeurs d'origines différentes, puisqu'il existe des antigènes tumoraux communs non seulement à un type particulier de tumeur (MART-1 par exemple dans le mélanome), mais aussi des antigènes communs à des tumeurs complètement différentes (comme les molécules impliquées dans la tumorigenèse, p53 par exemple) ;

v) l'utilisation d'exosomes peut aussi se révéler efficace dans le traitement de tumeurs exprimant de faibles niveaux de molécules de classe I du CMH, ou n'en exprimant pas du tout (ces tumeurs représentent 40-50% des cancers métastatiques

humains). En effet, les exosomes permettent le transfert d'antigènes intacts entre cellules tumorales et CD, ces antigènes étant ensuite présentés aux lymphocytes T par les molécules du CMH de la CD. Les résultats préliminaires montrent que les exosomes permettent d'induire le rejet de tumeurs murines exprimant de faibles
5 niveaux de molécules de classe I du CMH (comme MCA101, S. Rosenberg, NCI, Bethesda, U.S.A.). Ceci est probablement dû au fait que les niveaux d'expression de molécules du CMH nécessaires à l'induction d'une réponse immunitaire efficace sont beaucoup plus élevés que ceux nécessaires lors de la phase effectrice (cytotoxicité cellulaire) ;

10 vi) les exosomes seuls constituent en eux-mêmes, par leur pouvoir immunogène une modalité de vaccination prophylactique ou thérapeutique nouvelle et efficace.

Références

- Amigorena, S., Drake, J. R., Webster, P., and Mellman, I. (1994). Transient accumulation of new class II molecules in a novel endocytic compartment in B lymphocytes [see comments]. *Nature* 369, 113-120.
- Boczkowski, D., Nair, S. K., Snyder, D., and Gilboa, E. (1996). Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Experimental Medicine* 184, 465-72.
- Boon, T. (1992). Toward a genetic analysis of tumor rejection antigens. *Advances in Cancer Research* 58, 177-210.
- Espevik, T. & Nissen-Meyer, J. (1986) *J. Immunol. Methods* 95:99-103.
- Felder, S., Miller, K., Moehren, G., Ullrich, A., Schlessinger, J., and Hopkins, C. R. (1990). Kinase activity controls the sorting of the epidermal growth factor receptor within the multivesicular body. *Cell* 61:623-634.
- Gruenberg J. *et al.* (1989) "Characterization of the Early Endosome and Putative Endocytic Carrier Vesicles In Vivo and with an Assay of Vesicle Fusion In Vitro" *The Journal of Cell Biology* 108:1301-1316.
- Marincola F. *et al.* (1996) "Analysis of expression of the melanoma associated antigens MART-1 and gp100 in metastatic melanoma cell lines and in "in situ" lesions" *Journal of Immunotherapy* 19:192-205.
- Mayordomo, J. I., Zorina, T., Storkus, W. J., Zitvogel, L., Celluzzi, C., Falo, L. D., Melief, C. J., Ildstad, S. T., Kast, W. M., Deleo, A. B., and et al. (1995). Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with synthetic tumour peptides elicit protective and therapeutic antitumour immunity. *Nature Medicine* 1, 1297-302.
- Nabel, G.J., Gordon, D., Bishop, D.K., Nicholoff, B.J., Yang, Z.Y., Avuga, A., Cameron, M.J., Nabel, E.G., Chang, A.E. (1996) Immune response in human melanoma after transfer of an allogenic class I major histocompatibility complex gene with DNA-liposome complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:15388-18393.

Pardoll, D. M. (1995). Paracrine cytokine adjuvants in cancer immunotherapy. *Annual Review of Immunology* 13, 399-415.

5 Raposo, G., Nijman, H. W., Stoorvogel, W., Leijendekker, R., Harding, C. V.,
Melief, C. J. M., and Geuze, H. J. (1996). B lymphocytes secrete antigen-presenting
vesicles. *J. Exp. Med.* 183, 1161-1172.

10 Rosenberg, S. A., Kawakami, Y., Robbins, P. F., and Wang, R. (1996).
Identification of the genes encoding cancer antigens: implications for cancer
immunotherapy. *Advances in Cancer Research* 70, 145-77.

15 Traversasi, C., Van der Bruggen, P., Leuscher, I.F., Lurguin, C., Chamez, P., Van
Del, A., De Places, E., Amar-Costesec, A. and Boon, T. (1992) A nonapeptide
encoded by human gene MART-1 is recognized on HLA-A1 by cytotoxic T
lymphocytes directed against tumor antigen MZ2-E. *J. Exp. Med.* 176:1453-1457.

Walker S.A. *et al.* (1997). *Nature*, vol. 387, pp. 61 et suivantes.

20 Zitvogel, L., Robbins, P. D., Storkus, W. J., Clarke, M. R., Maeurer, M. J.,
Campbell, R. L., Davis, C. G., Tahara, H., Schreiber, R. D., and Lotze, M. T.
(1996). Interleukin-12 and B7.1 co-stimulation cooperate in the induction of effective
antitumor immunity and therapy of established tumors. *European Journal of
Immunology* 26, 1335-41 [a].

25 Zitvogel, L., Mayordomo, J. I., Tjandrawan, T., DeLeo, A. B., Clarke, M. R.,
Lotze, M. T., and Storkus, W. J. (1996). Therapy of murine tumors with tumor
peptide-pulsed dendritic cells: dependence on T cells, B7 costimulation, and T helper
cell 1-associated cytokines [see comments]. *Journal of Experimental Medicine* 183,
87-97 [b].

30 "Bafilomycins: A class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms,
animal cells, and plant cells" (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:7972-7976.

REVENDICATIONS

1. Vésicule désignée par "exosome dérivé de cellules tumorales" correspondant à une vésicule interne contenue dans un endosome d'une cellule tumorale et sécrétée par ladite cellule tumorale suite à la fusion de la membrane externe du susdit endosome avec la membrane cytoplasmique de la susdite cellule tumorale, lequel exosome dérivé de cellules tumorales

- est débarrassé de son environnement naturel,
- comprend une bicouche lipidique désignée par "surface" qui entoure une fraction cytosolique, et éventuellement

- présente sur sa surface des molécules de classe I du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) et/ou de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), éventuellement chargées en peptides antigéniques et/ou des molécules d'adhésion et/ou des molécules de co-stimulation lymphocytaire,

- et/ou contient dans sa fraction cytosolique des molécules antigéniques tumorales et/ou des immunomodulateurs et/ou chemo-attracteurs et/ou hormones et/ou agents cytotoxiques des acides nucléiques.

2. Exosome dérivé de cellules tumorales selon la revendication 1, présentant sur sa surface des molécules de classe I et/ou de classe II du CMH, éventuellement chargée en peptides antigéniques et contenant dans sa fraction cytosolique des molécules antigéniques tumorales.

3. Exosome dérivé de cellules tumorales selon l'une des revendications 1 ou 2,

- exprimant à sa surface des molécules de classe I et/ou de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), et/ou des antigènes caractérisés de tumeurs et/ou des molécules de co-stimulation lymphocytaire/adhésion et /ou des immunomodulateurs, et/ou chemo-attractants, exogènes par rapport à la cellule tumorale dont dérive l'exosome, ou

- contenant des antigènes tumoraux et/ou des immunomodulateurs et/ou des acides nucléiques ou des agents cytotoxiques ou des hormones exogènes par rapport à la cellule tumorale dont dérive l'exosome.

4. Procédé de préparation d'exosomes dérivés de cellules tumorales selon l'une des revendications de 1 à 3, comprenant les étapes de centrifugation différentielle de fractions membranaires de surnageants de culture ou de lysats de

cellules tumorales ou de suspensions tumorales fraîches et de récupération de la ou des fraction(s) contenant lesdits exosomes.

5 5. Procédé selon la revendication 4, de préparation d'exosomes dérivés de cellules tumorales selon l'une des revendications 1 à 3 dans lequel l'étape de centrifugation, selon la revendication 4, est effectuée :

- sur un prélèvement de sang efférent de la veine de l'organe tumoral isolé,
ou

10 - sur un prélèvement de sérum ou de plasma du sang circulant d'un patient,
ou

- à partir du produit de drainage (sérum physiologique contenant éventuellement de la dexaméthasone, ou agent cytotoxique stimulant l'exocytose des exosomes) d'un organe excisé chirurgicalement et traité *ex vivo* par circuit isolé-perfusé pour le drainage de la tumeur qu'il porte, ou

15 - à partir du surnageant d'un explant tumoral dissocié *in vitro*.

6. Procédé de préparation d'exosomes dérivés de cellules tumorales :

* soit à partir de cultures de cellules tumorales et comprenant

20 • une irradiation, à une intensité suffisante pour provoquer l'action cytostatique des cellules tumorales et ne dépassant pas 15.000 rads avantageusement à environ 10.000 rads, des cellules tumorales avant, pendant ou après leur mise en culture, ou

25 • un traitement, pendant la culture, des cellules tumorales, à l'aide de stéroïdes, par exemple dexaméthasone, ou d'agents cytotoxiques, par exemple 5-fluorouracile (5 Fu) ou cis-platinum, docetaxel, anthracycline, poison du fuseau, antipirimidique, ou d'interleukine par exemple IL10, IL2, IL15, GM-CSF,

• un traitement avec un agent susceptible d'augmenter la quantité d'endosomes multivésiculaires, par exemple le nocodazole et donc d'augmenter la production d'exosomes,

30 * soit à partir d'un prélèvement de sérum physiologique drainant un organe excisé chirurgicalement et traité *ex vivo* par circuit isolé-perfusé pour le drainage de la tumeur qu'il porte, ou soit à partir du surnageant d'un explant tumoral dissocié *in vitro* et comprenant

35 • un traitement à l'aide de stéroïdes, par exemple dexaméthasone, ou d'agents cytotoxiques, par exemple 5-fluorouracile (5 Fu), cis-platinum, taxanes, ou d'interleukine par exemple IL-10, IL-2, GM-CSF.

7. Procédé de préparation d'exosome de cellules tumorales selon la revendication 3, comprenant

- soit la modification génétique des cellules tumorales par des gènes exogènes codant pour des molécules de classe I et/ou de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), et/ou des gènes codant pour des antigènes caractérisés de tumeurs et/ou des gènes codant pour des molécules de co-stimulation/adhésion ou des chimokines attractantes, les produits de ces gènes exogènes pouvant se trouver exprimés à la surface des exosomes et/ou être séquestrés à l'intérieur des exosomes,

- soit la modification *in vitro* des exosomes produits par les cellules tumorales, telle que l'introduction (par électroporation, par fusion avec un liposome synthétique, par virus recombinant ou par méthode chimique), de protéines ou d'acides nucléiques ou médicaments pharmaceutiquement définis dans et/ou avec les exosomes.

8. Cellule présentatrice d'antigènes, notamment lymphocyte B, macrophage, monocyte ou cellule dendritique chargées en exosomes dérivés de cellules tumorales selon l'une quelconque des revendications 1 à 3.

9. Procédé de préparation de cellules présentatrices d'antigènes selon la revendication 8, comprenant les étapes d'incubation de cellules présentatrices d'antigènes en présence d'exosomes dérivés de cellules tumorales selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 et de récupération des susdites cellules présentatrices d'antigène chargé du susdit exosome de cellule tumorale.

10. Vésicule membranaire débarrassée de son environnement naturel, sécrétée par des cellules présentatrices d'antigène chargées en exosomes dérivés de cellules tumorales selon l'une quelconque des revendications 1 à 3.

11. Procédé de préparation d'une vésicule membranaire selon la revendication 10, comprenant :

- une étape de préparation d'un exosome dérivé de cellules tumorales selon la revendication 4,

- une étape d'incubation d'un exosome dérivé de cellules tumorales avec des cellules présentatrices d'antigène,

- une étape de centrifugation différentielle de fractions membranaires de surnageants de culture ou de lysats des susdites cellules présentatrices d'antigènes, chargées en exosomes et

- une étape de récupération de la fraction contenant les susdites vésicules tumorales.

5

12. Utilisation :

- d'exosomes dérivés de cellules tumorales selon l'une des revendications 1 à 3, ou

- de cellules présentatrices d'antigènes selon la revendication 8, ou

10 - de vésicules membranaires selon la revendication 10, pour la stimulation et éventuellement l'amplification *in vitro* de lymphocytes T spécifiques d'antigènes contenues dans les susdits exosomes, ou les susdites cellules présentatrices d'antigènes ou les susdites vésicules membranaires, - ou de lymphocytes B, et notamment pour la stimulation et l'amplification *in vitro* de lymphocytes T.

15

13. Utilisation d'exosomes dérivés de cellules tumorales selon l'une des revendications 1 à 3, ou de cellules présentatrices d'antigènes selon la revendication 8, ou de vésicules membranaires selon la revendication 10, pour la création *ex vivo* d'un répertoire de lymphocytes T, susceptibles de reconnaître des antigènes
20 spécifiques exprimés par les susdits exosomes selon l'une des revendications 1 à 3 dans les susdites cellules présentatrices d'antigène selon la revendication 8, ou dans les susdites vésicules membranaires selon la revendication 10.

14. Médicament contenant à titre de substance active un exosome dérivé de
25 cellules tumorales selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, ou une cellule présentatrice d'antigène chargé en exosome selon la revendication 8, ou une vésicule membranaire selon la revendication 10, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

15. Utilisation d'un exosome dérivé de cellules tumorales, selon l'une des revendications 1 à 3, ou d'une cellule présentatrice d'antigène chargée en exosome selon la revendication 8, ou d'une vésicule membranaire selon la revendication 10, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de tumeurs, solides et
30 hématopoïétiques.

35

- 5 16. Utilisation d'un exosome dérivé de cellules tumorales, ou d'une fraction ou d'un composant constitutif d'un exosome dérivé de cellules tumorales selon l'une des revendications 1 à 3, ou d'une vésicule membranaire selon la revendication 10, pour l'amélioration de l'efficacité d'un liposome synthétique pour le transfert de matériel biologique dans une cellule *in vitro* ou *in vivo*.

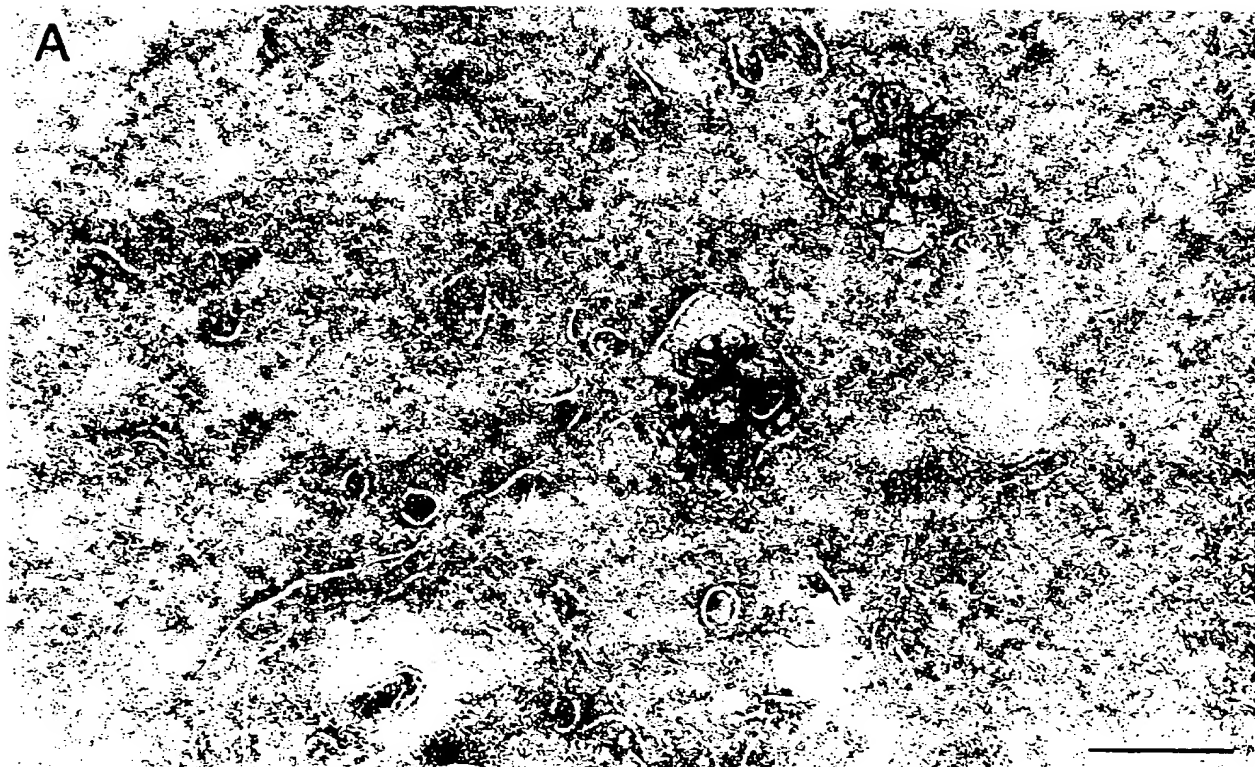


Figure 1A

2/11

B

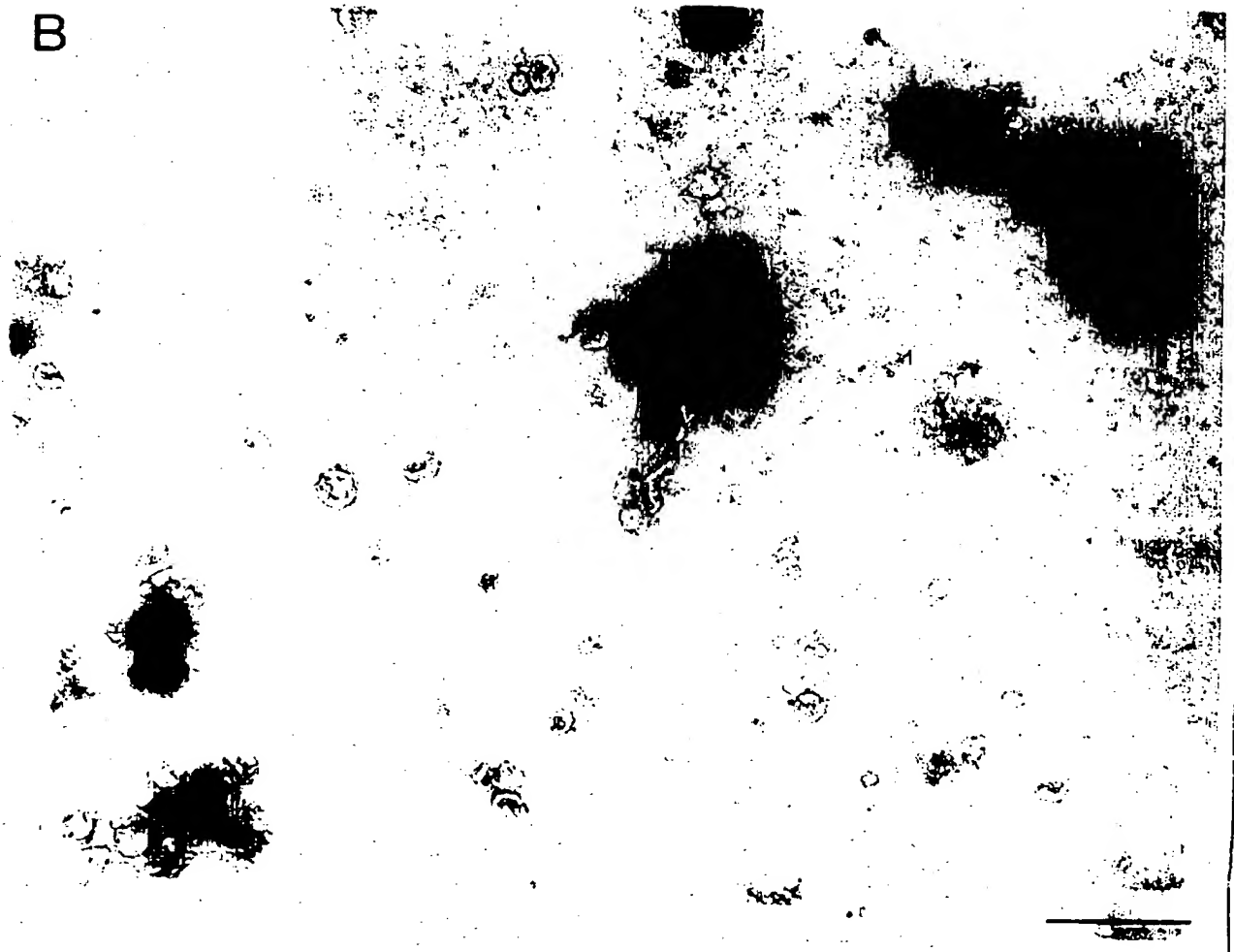


Figure 1B.

Figure 2A

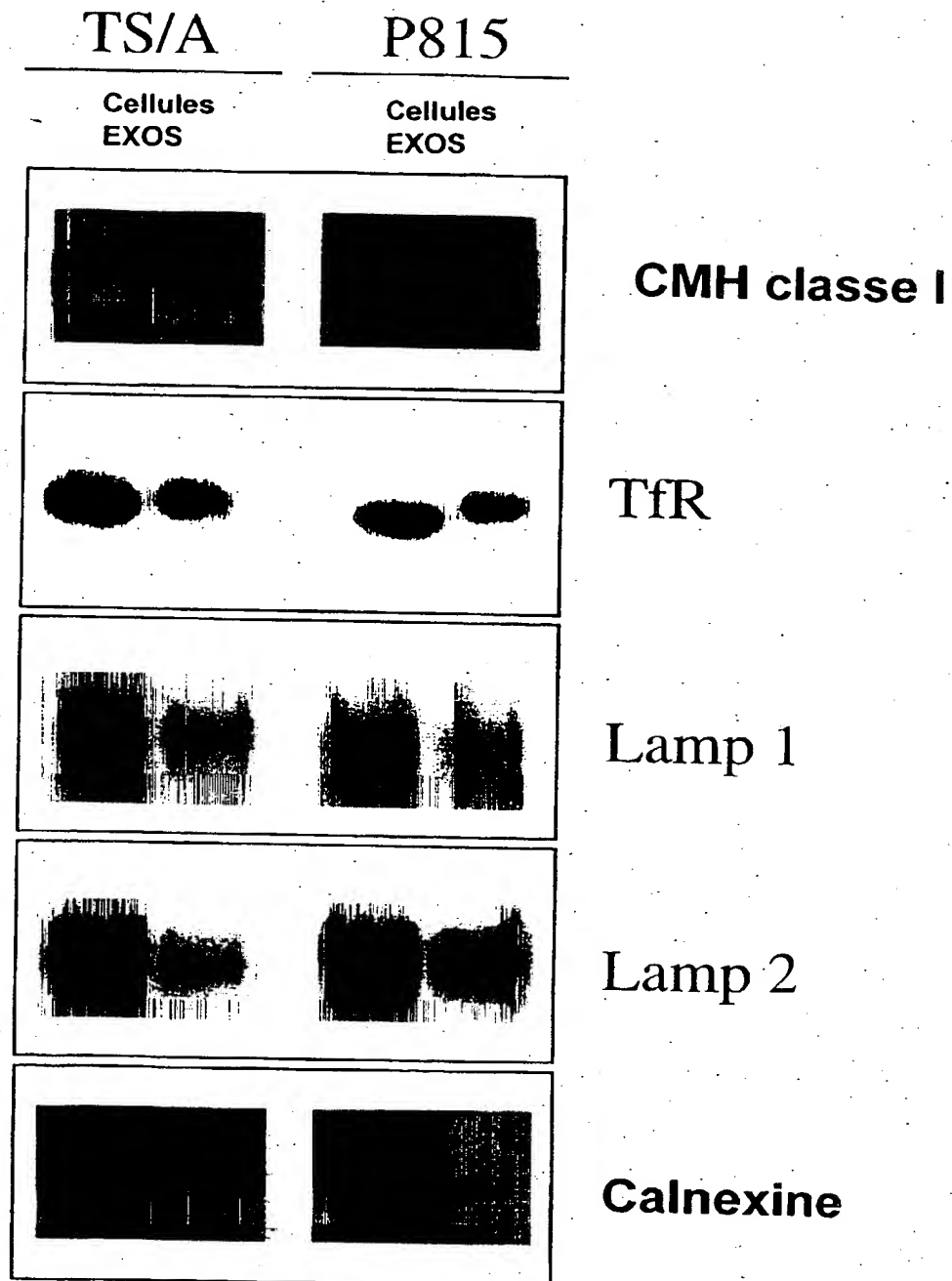
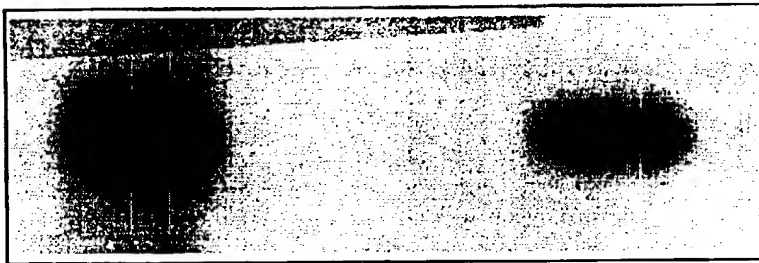


Figure 2B

Cellules

Exosomes



MART-1

5/11

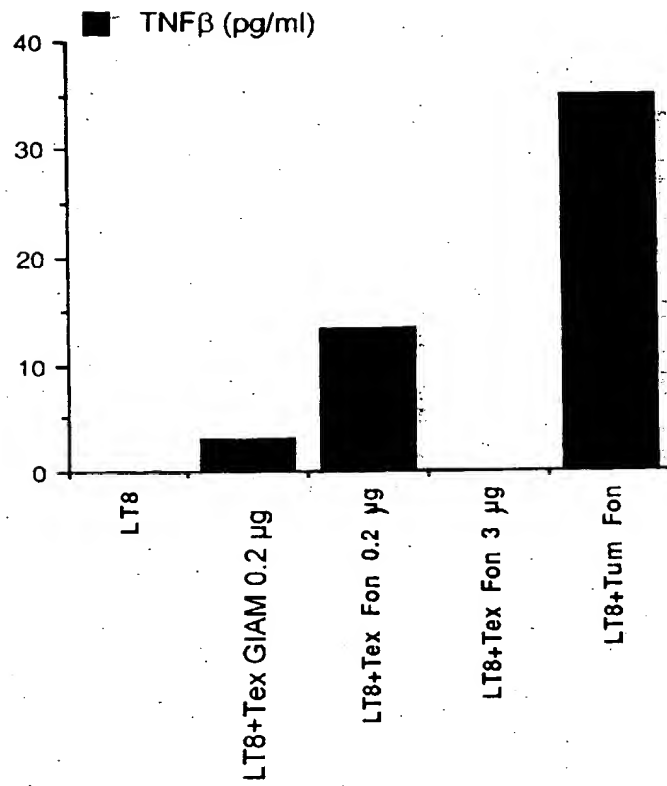


FIGURE 3.

6/11

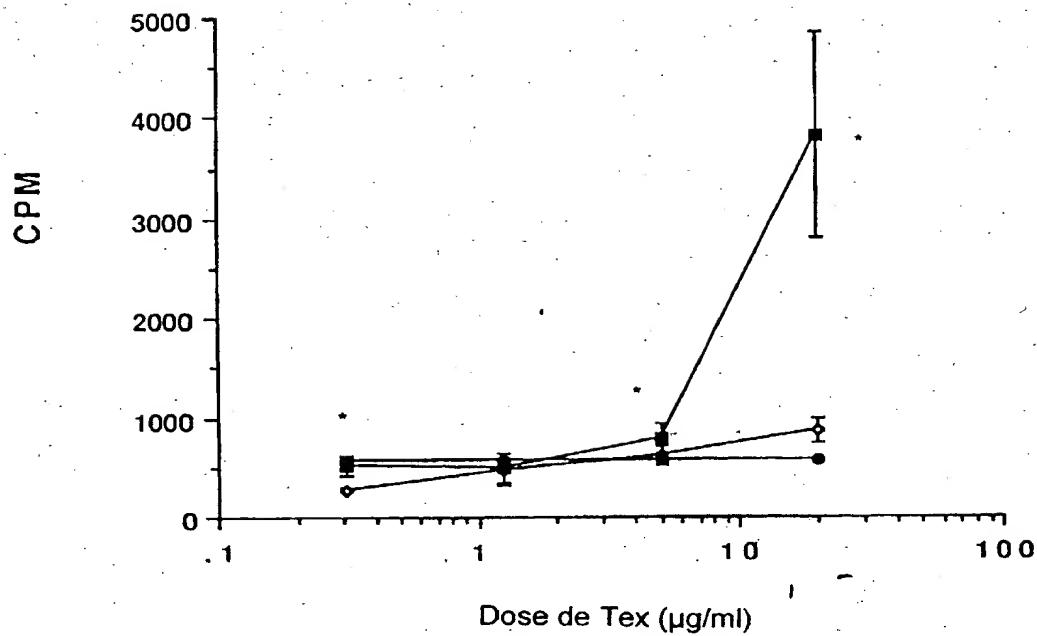


FIGURE 4.

7/11

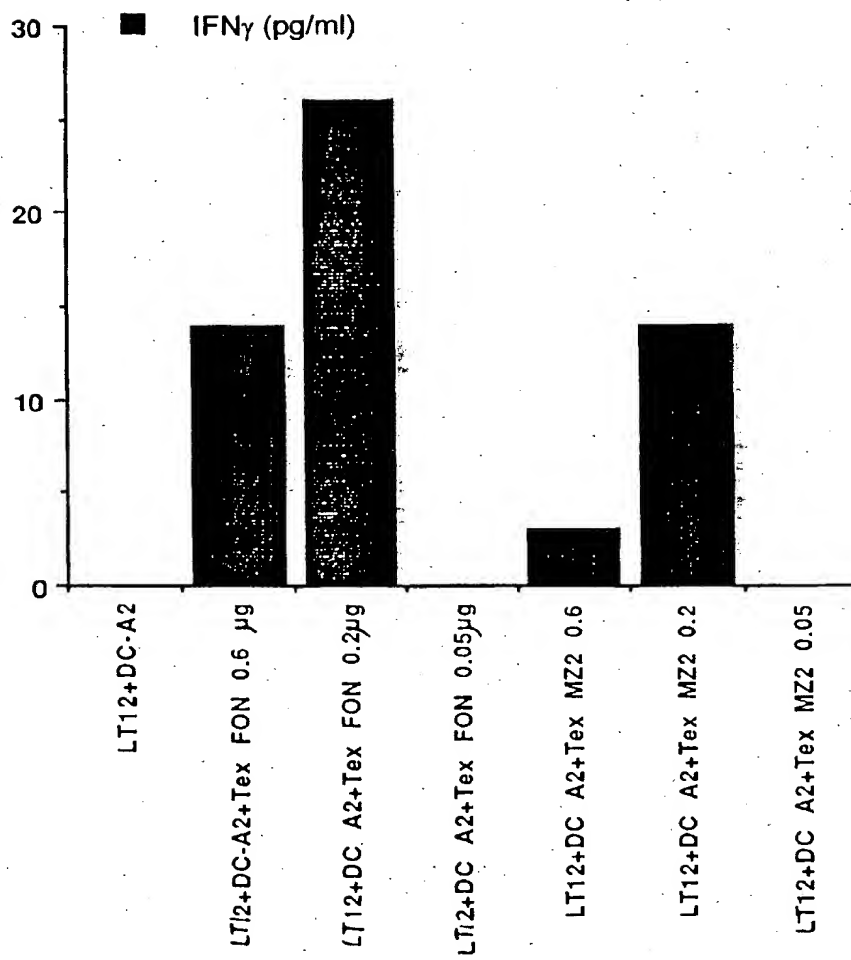


FIGURE 5

8/11

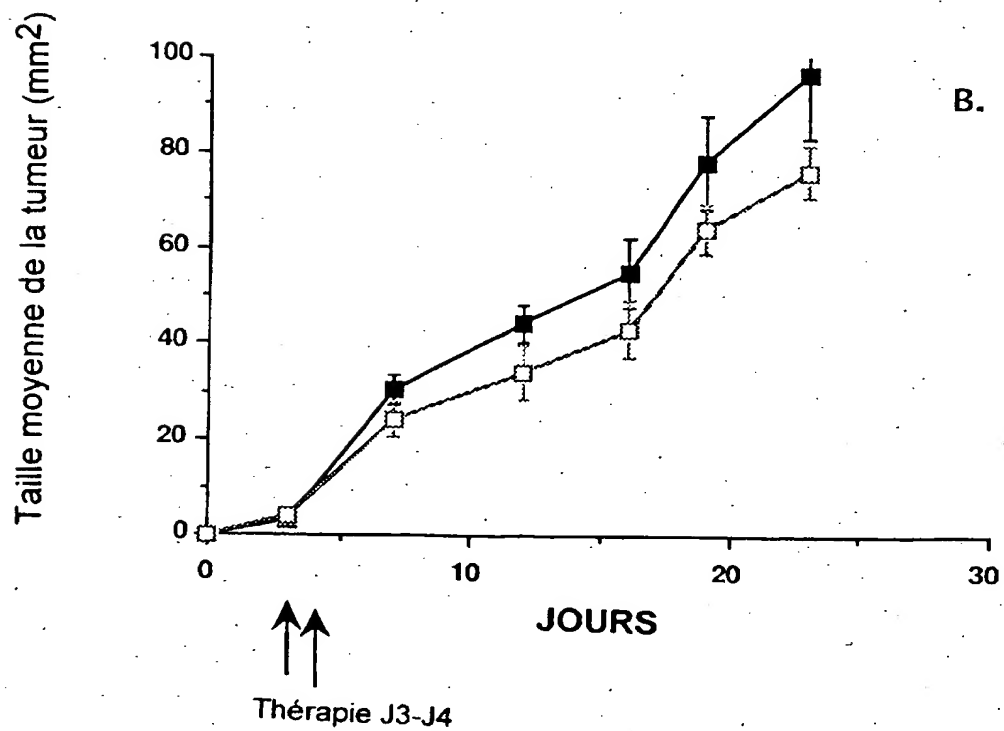
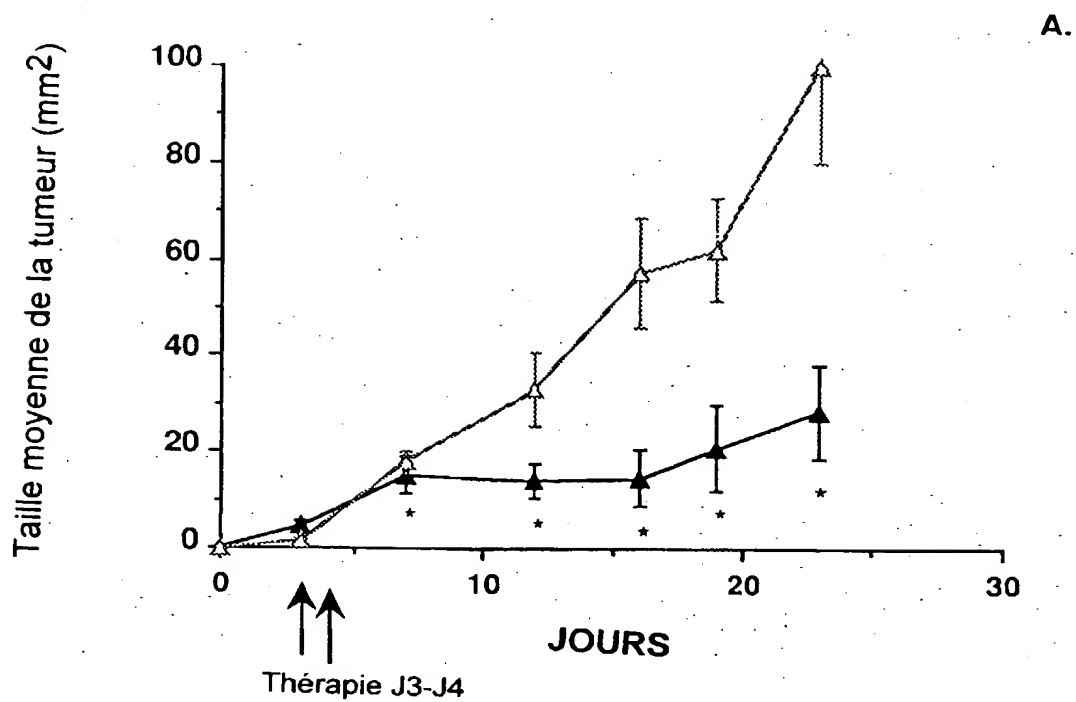


FIGURE 6.

9/11

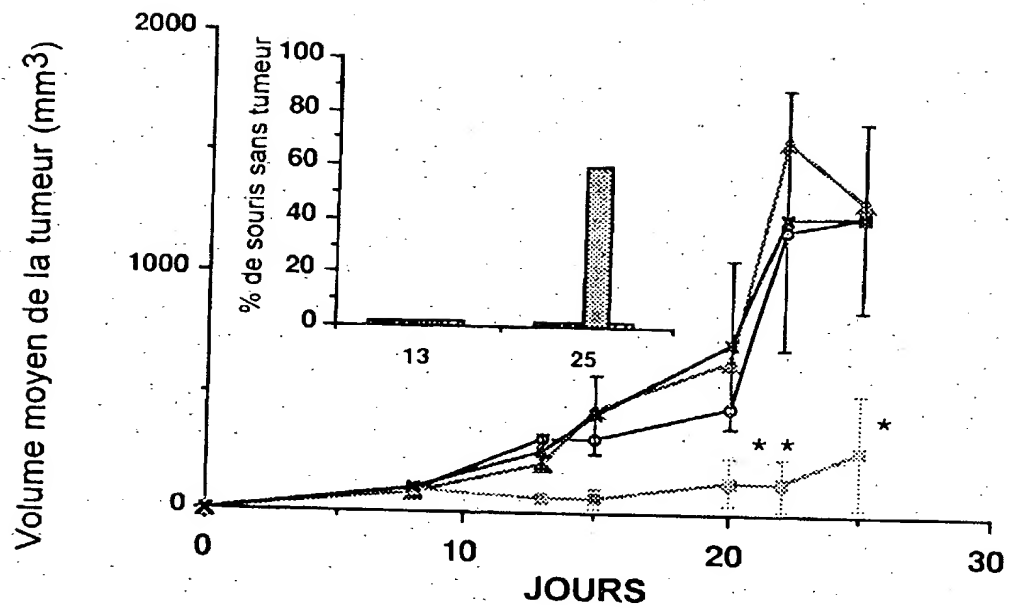


FIGURE 7

10/11

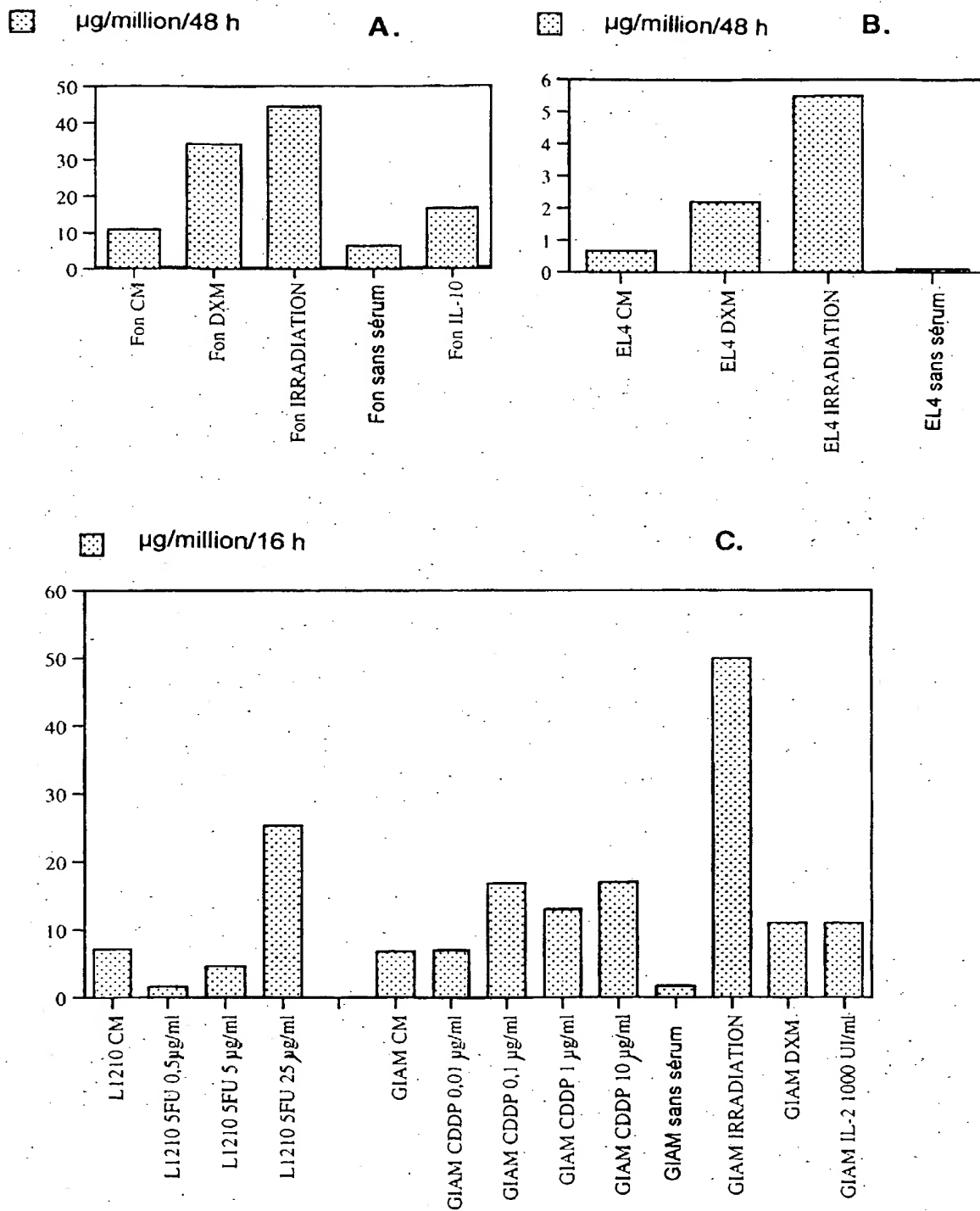
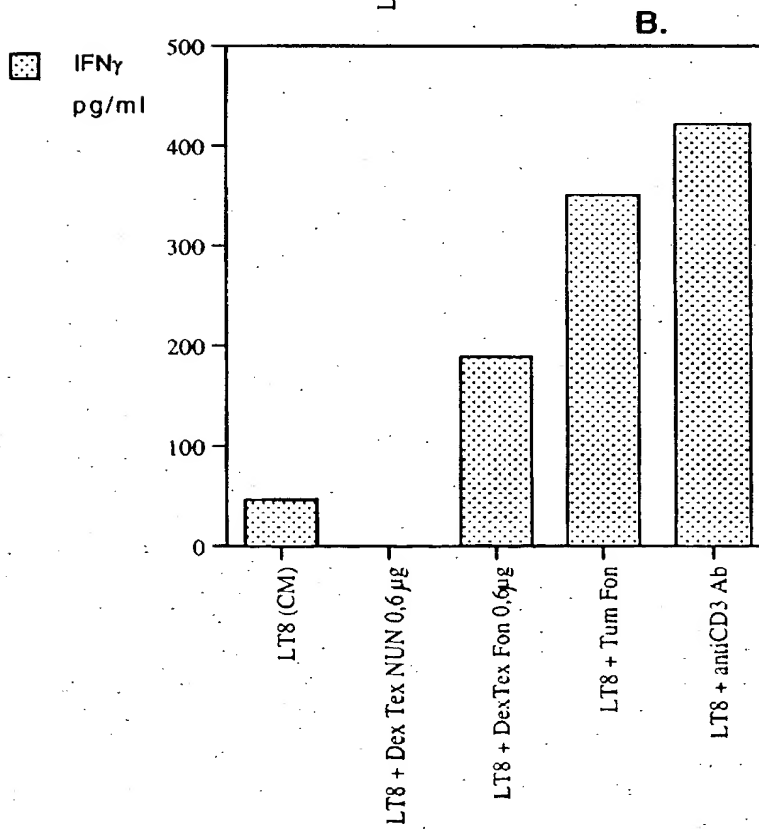
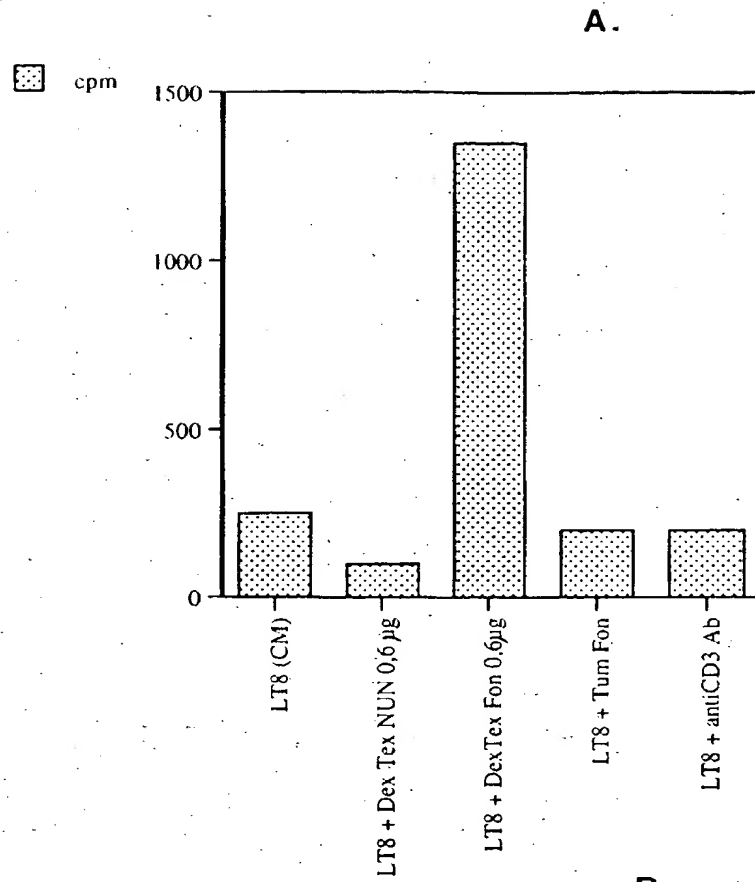


FIGURE 8

**FIGURE 9**

INSTITUT NATIONAL

de la

PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIREétabli sur la base des dernières indications
déposées avant le commencement de la rechercheN° d'enregistrement
nationalFA 546261
FR 9709007

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
D,X	RAPOSO ET AL: "B LYMPHOCYTES SECRETE ANTIGEN-PRESENTING VESICLES" JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol. 183, 1996, pages 1161-1172, XP002060486 * le document en entier *	1-5,7-16
D,X	WO 97 05900 A (UNIV LEIDEN ;UNIV UTRECHT (NL); GEUZE JOHANNES J (NL); MELIEF CORN) * le document en entier *	1-5,7-16
A	TRAMS ET AL: "EXFOLIATION OF MEMBRANE ECTO-ENZYMES IN THE FORM OF MICRO-VESICLES" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol. 645, 1981, pages 63-70, XP002060487 * le document en entier *	
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
		A61K
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
27 mars 1998		Sitch, W
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
X: particulièrement pertinent à lui seul Y: particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A: pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O: divulgation non-écrite P: document intermédiaire		
T: théorie ou principe à la base de l'invention E: document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D: cité dans la demande L: cité pour d'autres raisons &: membre de la même famille, document correspondant		

EPO FORM 1503 (3.92) (P04C13)

THIS PAGE BLANK (USPTO)